

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización de las células mesenquimales del paquete  
adiposo de Hoffa en pacientes con diferente grado de  
afectación articular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**José Manuel Argüello Cuenca**

DIRECTORES

**Francisco Forriol Campos  
Javier Vaquero Martín**

**Madrid, 2017**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Medicina**

**Programa de Doctorado en Investigación Médico-Quirúrgica**

**Departamento de Cirugía**



**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES DEL  
PAQUETE ADIPOSEO DE HOFFA EN PACIENTES CON  
DIFERENTE GRADO DE AFECTACIÓN ARTICULAR**

**JOSÉ MANUEL ARGÜELLO CUENCA**

**Madrid, Noviembre 2015**







**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Medicina**

**Programa de Doctorado en Investigación Médico-Quirúrgica**

**Departamento de Cirugía**



**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES DEL  
PAQUETE ADIPOSO DE HOFFA EN PACIENTES CON  
DIFERENTE GRADO DE AFECTACIÓN ARTICULAR**

**AUTOR:**

**JOSÉ MANUEL ARGÜELLO CUENCA**

**DIRECTORES DE TESIS DOCTORAL:**

**FRANCISCO FORRIOL CAMPOS**

**JAVIER VAQUERO MARTÍN**

**Madrid, Noviembre 2015**





## Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL				
Nombre del Doctorando	JOSÉ MANUEL ARGÜELLO CUENCA			
Título de la Tesis	CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES DEL PAQUETE ADIPOSO DE HOFFA EN PACIENTES CON DIFERENTE GRADO DE AFECTACIÓN ARTICULAR			
Facultad o Centro	Medicina			
DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL				
Nombre Completo	Francisco Forriol Campos			
Centro al que pertenece y dirección	Universidad San Pablo – CEU Facultad de Medicina Campus Montepríncipe, 28668 – Boadilla del Monte, Madrid			
D.N.I./Pasaporte	19460896-K			
e-mail	<a href="mailto:fforriol@gmail.com">fforriol@gmail.com</a>			
VALORACIÓN DE LA TESIS				
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	x			
Definición Objetivos	x			
Metodología	x			
Relevancia Resultados	x			
Discusión / Conclusiones	x			

### INFORME:

El trabajo del doctorando es original y está poco referenciado en la bibliografía especializada. Parte de una idea original como es utilizar el paquete adiposo de Hoffa para extraer y diferenciar células mesenquimales pluripotenciales de la grasa a condrocitos. Son estudios preliminares y básicos que podrían facilitar, por el acceso y su cercanía, la diferenciación celular e, incluso, la terapia génica para el tratamiento de las lesiones articulares de la rodilla.

El trabajo está bien desarrollado metodológicamente, parte de una hipótesis atractiva y presenta unos resultados con una discusión de los mismos que aunque no despeja todas las dudas abre una línea de investigación para el futuro. El trabajo servirá de referencia para trabajos posteriores. La bibliografía dedicada al tema está referenciada.

Madrid, a 21 de septiembre de 2015

Fdo. : Francisco Forriol Campos







## Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL				
Nombre del Doctorando	JOSÉ MANUEL ARGÜELLO CUENCA			
Título de la Tesis	CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES DEL PAQUETE ADIPOSO DE HOFFA EN PACIENTES CON DIFERENTE GRADO DE AFECTACIÓN ARTICULAR			
Facultad o Centro	MEDICINA			
DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL				
Nombre Completo	Javier Vaquero Martin			
Centro al que pertenece y dirección	Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Hospital General Universitario Gregorio Marañón.			
D.N.I/Pasaporte	02193504v			
e-mail	<a href="mailto:vaqueroct@gmail.com">vaqueroct@gmail.com</a>			
	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	x			
Definición Objetivos	x			
Metodología	x			
Relevancia Resultados	x			
Discusión / Conclusiones	x			

### INFORME:

La hipótesis de la Tesis es original y los objetivos concretos y claros. En cuanto al material, es de destacar el estudio preliminar que permitió comprobar el papel de “mensajero” del líquido sinovial sobre cultivos de condrocitos, que permitió concretar la hipótesis. El número de ensayos en el estudio es limitado, pero el coste de la metodología es elevado.

Cabe destacar que los resultados ponen de manifiesto por primera vez el importante papel que juega el paquete adiposo de Hoffa en la artrosis a pesar de ser un tejido extrasinovial.

La discusión confirma la escasez de trabajos dedicados a este tema y abre la puerta a futuros estudios más amplios.

Finalmente la bibliografía es amplia y actual.

Madrid, a 22 de Septiembre de 2015

**Fdo. : Javier Vaquero Martín**



*...a Laura,*

*lo mejor que me ha pasado en la vida...*



# AGRADECIMIENTOS

---

*“Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a  
hombros de gigantes.”*

*(Bernardo de Chartres. S.XII)*



*A mi abuelo por ser un ejemplo constante*

*A mis padres por quitarse de ellos para ser lo que soy*

*A Laura y Ramón por su generosidad y compromiso infinitos*

*A Patricia por hacerme tener los pies en la Tierra*

*A Carlota y Ramón por su consideración y atención como un*

*hermano más*

*A mis amigos de trabajo por hacer que madrugar merezca la pena*

*A mis directores de tesis por el tiempo, por las facilidades dadas y*

*por las enseñanzas aprendidas*

*A Arancha, Beatriz, Irene, Sonia y al departamento del IMMA, sin*

*las que este proyecto no se hubiera podido llevar a cabo*

*A mis compañeros traumatólogos y enfermeros del HU Infanta*

*Cristina y del HGU Gregorio Marañón, por su paciencia y*

*comprensión*

*A mi jefe, Fernando Delgado Velilla, por facilitarme el tiempo*

*necesario para el desarrollo de esta tesis*

*A Bioibérica por su apoyo económico al confiar en este proyecto*

*A Javier Narbona y a Francisco Chana por guiarme y corregirme*

*con su sabio conocimiento*



*Y por último, a Laura, mi mujer, la que da sentido a mi vida, mi mayor apoyo, la que me hace ser mejor persona día a día y gracias a la cuál he podido presentar este trabajo*

# ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS



ACL: (*del inglés anterior cruciate ligament*) ligamento cruzado anterior.

ACR: (*del inglés*) Colegio Americano de Reumatología.

AP: antecedentes personales.

BMP: (*del inglés*) proteína morfogenética del hueso.

CFU: (*del inglés*) unidad formadora de colonias.

CFU-F: (*del inglés*) fibroblasto-unidad formadora de colonias.

Cls: células.

CMN: células mononucleadas.

CTE: células troncales embrionarias.

CTM: célula troncal mesenquimal.

CTS: célula troncal somática.

DMEM: (*del inglés*) medio de Eagle modificado por Dulbecco.

DMOAD: (*del inglés*) fármacos modificadores de la enfermedad artrósica.

DMSO: dimetilsulfóxido.

DX: diagnóstico.

FBS: (*del inglés*) suero bovino fetal.

FGF: (*del inglés*) factor de crecimiento fibroblástico.

FITC: fluoresceína isotiocianato.

GMP: (*del inglés*) normas de buena manufactura.

HGUGM: Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

HLA: (*del inglés*) antígeno leucocitario humano.

ICAM: (*del inglés*) molécula de adhesión intercelular.

ICRS: (*del inglés*) sociedad internacional para la reparación condral.

IMC: índice de masa corporal.

IDO: indolamina 2-3 dioxigenasa.

IFN: interferón.

IGF: (*del inglés*) factor de crecimiento insulínico.

IL: interleuquina.

IMMA: Instituto de Medicina Molecular Aplicada (San Pablo CEU).

ISCT: (*del inglés*) sociedad internacional de terapia celular.

LSV: líquido sinovial.

MHC: (*del inglés*) complejo mayor de histocompatibilidad.

MMP: metaloproteinasa.

MO: médula ósea.

MSC: (*del inglés*) células madre de origen mesenquimal.

OA: (*del inglés, osteoarthritis*) artrosis.

OPG: osteoprotegerina.

PBS: (*del inglés*) solución salina tamponada con fosfato, búfer fosfato.

PCR: (*del inglés*) reacción en cadena de la polimerasa.

PG: prostaglandina.

PTH: (*del inglés*) hormona paratiroidea.

PTH1r: (*del inglés*) receptor 1 de la hormona paratiroidea.

PTR: prótesis total de rodilla.

RMN: resonancia magnética nuclear.

RNA: ácido ribonucleico.

RPM: revoluciones por minuto.

SER: Sociedad Española de Reumatología.

SNP: (*del inglés*) polimorfismos de un único nucleótido.

SSC: (*del inglés Side S Catter*) dispersión lateral.

ST: sangre total.

TGF: (*del inglés*) factor de crecimiento tumoral.

TIMP: inhibidor tisular de las metaloproteinasas.

VCAM: (*del inglés*) molécula de adhesión vascular.

VEGF: (*del inglés*) factor de crecimiento vascular endotelial.



# ÍNDICE

---





<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
INTRODUCCIÓN .....	3
MATERIAL Y MÉTODOS .....	4
RESULTADOS .....	5
DISCUSIÓN .....	7
CONCLUSIONES .....	11
<b>SUMMARY .....</b>	<b>13</b>
INTRODUCTION .....	15
MATERIAL AND METHODS .....	16
RESULTS .....	17
DISCUSSION .....	19
CONCLUSSIONS .....	23
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>25</b>
SITUACIÓN ACTUAL DE LAS LESIONES CONDRALES .....	27
CARTÍLAGO .....	31
<i>DEGENERACIÓN ARTICULAR. ARTROSIS .....</i>	<i>35</i>
<i>RESPUESTA DEL CONDROCITO A LA LESIÓN ARTICULAR .....</i>	<i>38</i>
<i>BIOLOGÍA DEL CARTILAGO ARTICULAR .....</i>	<i>40</i>
FACTORES DE CRECIMIENTO ANABÓLICO .....	41
CITOQUINAS CATABÓLICAS .....	43
METALOPROTEINASAS .....	45
LÍQUIDO SINOVIAL .....	48
CÉLULAS MESENQUIMALES .....	50
<i>BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES .....</i>	<i>50</i>
DIFERENCIACIÓN HACIA CARTÍLAGO .....	54
CAPACIDAD INMUNORREGULADORA .....	57
“HOMING” .....	58
<i>EFFECTOS DE LA EDAD Y FACTORES EXTERNOS SOBRE LAS CTM .</i>	<i>59</i>
<i>FUENTES PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES</i>	
<i>MESENQUIMALES .....</i>	<i>60</i>
<i>INDUCCIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN HACIA GRASA, HUESO Y</i>	
<i>CARTÍLAGO .....</i>	<i>61</i>
<i>USOS TERAPÉUTICOS DE LAS CÉLULAS TRONCALES</i>	
<i>MESENQUIMALES .....</i>	<i>62</i>
PAQUETE ADIPOSO DE HOFFA .....	63
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>65</b>
HIPÓTESIS .....	67
OBJETIVOS .....	67
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>69</b>
DISEÑO DEL ESTUDIO .....	71
SELECCIÓN DE PACIENTES .....	72

ESTUDIO PRELIMINAR CON CULTIVO CONDRAL .....	78
<i>AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CONDROCITOS</i> .....	78
<i>ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MTS</i> .....	84
SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO. AISLAMIENTO, CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE GRASA DE HOFFA .....	85
<i>CULTIVO DE CÉLULAS MESENQUIMALES</i> .....	90
<i>OBTENCIÓN DE RNA Y PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL</i> .....	92
TRANSFERENCIA WESTERN .....	92
<i>PROTEÓMICA</i> .....	93
ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL 2-DE Y EXPRESIÓN DIFERENCIAL CUANTITATIVA 2D-DIGE .....	93
IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF/TOF .....	94
ESTUDIO DE LÍQUIDO SINOVIAL .....	94
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	95
<i>ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA</i> .....	95
<i>ESTADÍSTICA INFERENCIAL</i> .....	95
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>97</b>
ESTUDIO PRELIMINAR .....	99
SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO .....	101
<i>OPG</i> .....	102
<i>PTH 1r</i> .....	105
<i>FGF2</i> .....	108
<i>TGFb</i> .....	111
<i>MMP3</i> .....	114
<i>MMP13</i> .....	117
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	120
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>123</b>
MOTIVO DEL ESTUDIO .....	125
<i>ARTROSIS</i> .....	125
<i>EL PAQUETE ADIPOSO DE HOFFA</i> .....	131
<i>BIOMARCADORES ESTUDIADOS</i> .....	134
<i>OPG</i> .....	136
<i>PTH1r</i> .....	137
<i>FGF2</i> .....	139
<i>TGFb</i> .....	141
<i>MMP3</i> .....	144
<i>MMP13</i> .....	144
<i>PAPEL DE LAS MSC EN LA ARTROSIS DE RODILLA</i> .....	147
ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	153
<i>ESTUDIO PRELIMINAR DEL PAPEL PROTECTOR DEL LÍQUIDO SINOVIAL</i> .....	153
<i>DIFERENCIACIÓN DE MSC DE HOFFA A CONDROCITOS. MARCADORES. REACCIÓN A LÍQUIDO SINOVIAL ARTRÓSICO</i> .....	157

<b>APLICACIÓN CLÍNICA DE NUESTRO ESTUDIO Y FUTURAS LÍNEAS DE TRABAJO .....</b>	<b>163</b>
MSC: INOCULACIÓN/TRASPLANTE DE HOFFA .....	165
CITOQUINAS: ANTICUERPOS Y TERAPIA GÉNICA .....	169
PERFIL GENÉTICO .....	170
<b>LIMITACIONES DE NUESTRO ESTUDIO .....</b>	<b>173</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>177</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>181</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>205</b>
ANEXO I: ACEPTACIÓN CEIC HGUGM .....	207
ANEXO II: CONSENTIMIENTO INFORMADO .....	208
ANEXO III: V BECA DE INVESTIGACIÓN A LA CONDROPROTECCIÓN (HYALGAN®) 2011 .....	212
ANEXO IV: PRESENTACIÓN CONGRESO SEIQ .....	213
ANEXO V: PUBLICACIÓN TRABAJO .....	214



# RESUMEN

---



## INTRODUCCIÓN

---

Desde la antigüedad es conocida la problemática que ocasionan las lesiones condrales y su dificultad de tratamiento por el escaso poder reparativo que presenta el cartílago. Hoy día son muchas las técnicas, algunas de ellas de complejidad y coste muy elevados, que tratan de dar solución a esta situación, dando idea de la magnitud del problema al que nos enfrentamos. El gran caballo de batalla al que nos enfrentamos en la lucha contra la degeneración articular o artrosis, no es otro que tratar de actuar en fases tempranas de la enfermedad en las que aún el proceso pudiera ser reversible. Es por ello que se dedica un gran esfuerzo al diagnóstico precoz de la enfermedad, con medios diferentes a los tradicionales (Rx), como son la RMN, artroscopia, etc. Sin embargo, la situación actual nos lleva un punto más allá en el tratamiento temprano de la artrosis, actuando en fase preclínica, a nivel molecular y celular. Fruto de esta preocupación, gran cantidad de factores de crecimiento, citoquinas y metaloproteinasas han sido descubiertos como integrantes del puzle bioquímico de la artrosis, sin que hasta la fecha conozcamos el factor determinante a controlar para evitar la degeneración articular.

Es por ello que nos planteamos el papel que juega una estructura intraarticular pero extrasinovial de la rodilla, como es el paquete adiposo de Hoffa, de la cual es sabido que contiene células mesenquimales multipotenciales y libera biomarcadores, pero no estaba definido aún con claridad su implicación en la artrosis, ni la determinación de biomarcadores durante el proceso de diferenciación de MSC de grasa de Hoffa a condrocitos



ni el efecto del líquido sinovial artrósico sobre estos cultivos. Así mismo y de manera preliminar, puesto que íbamos a realizar determinaciones en líquido sinovial, nos planteamos cómo actuaba el líquido sinovial artrósico como medio de cultivo de condrocitos de superficie articular y como agente frente a productos dañinos como el Etopósido.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Se seleccionaron 6 pacientes diagnosticados de artrosis de rodilla grado III o superior de la escala de Kellgren-Lawrence que estaban en lista de espera para someterse a artroplastia total de rodilla (grupo de estudio) y 6 pacientes que fueron intervenidos de la rodilla por un diagnóstico que no era artrosis como lesión de LCA, lesión meniscal o inestabilidad femoro-patelar (grupo control). En todos los pacientes se tomaron muestras de líquido sinovial, grasa de Hoffa y cartílago.

El estudio se dividió en dos fases. Una fase preliminar en la que se estudió el papel ante agentes dañinos del líquido sinovial artrósico para cultivos de condrocitos a partir de cartílago articular maduro de rodillas artrósicas. En una segunda fase se comparó el comportamiento de las CTM de grasa de Hoffa diferenciadas a condrocitos en distintas fases de su cultivo (días 0, 15, 28), así como su respuesta diferencial ante el tratamiento con líquido sinovial artrósico (día 29), a través de las determinaciones de distintos biomarcadores: OPG, PTH1r, FGF2, TGFb, MMP3 y MMP13.

## RESULTADOS

---

En la fase preliminar, objetivamos una disminución en el número total de condrocitos muertos al exponer el cultivo condral a etopósido (ETO), si en el medio de cultivo añadíamos líquido sinovial de pacientes artrósicos, frente a los cultivos condrocitarios en los que sólo había medio de cultivo ( $p<0,05$ ). Sin embargo no existe significación estadística con todos los grupos de cultivos, sino que parece líquido sinovial dependiente.

En la segunda fase del estudio, se demostró que la expresión de OPG y PTH1r siguieron, durante la diferenciación de las MSC de la grasa de Hoffa, el mismo comportamiento. En ambos casos, la expresión, aunque fue aumentando en los tres periodos analizados, 0, 15 y 28 días, no mostró diferencias significativas. Esto sucedió tanto en las células de la rodilla control como en la rodilla artrósica. Comparando las expresiones entre el grupo control y el grupo artrósico, en cada periodo analizado, vimos mayor expresión de OPG en el día 15 en el grupo artrósico ( $P<0,05$ ) y menor en el día 28 en este mismo grupo ( $p<0,05$ ). Sin embargo, al añadir líquido sinovial artrósico, en los cultivos control aumentó de forma estadísticamente significativa, tanto la expresión de OPG ( $p<0,001$ ) como de PTH1r ( $p<0,01$ ). Esto no ocurrió en las rodillas artrósicas.

El comportamiento de la expresión de FGF2, en las células control, durante la diferenciación aumento progresivamente, sin presentar diferencias significativas. En los cultivos de la rodilla artrósica no se apreciaron diferencias

durante la diferenciación. Al añadir líquido sinovial artrósico en el cultivo del día 28, disminuyó de manera significativa ( $p<0,01$ ) en el grupo control mientras que no sufrió alteraciones en el grupo artrósico. Al comparar ambos grupos, control y artrósico, por periodos vimos menor expresión de FGF2 tanto en el día 15 ( $p<0,01$ ) como en el 28 ( $p<0,01$ ).

La expresión de TGFb, aumentó en el día 15 en el grupo control y se mantuvo sin variaciones durante el resto de los días. Mientras que en el grupo artrósico no sufrió modificaciones durante el proceso. Al añadir líquido sinovial artrósico aumentó la expresión de TGFb en el grupo control ( $p<0,05$ ) pero no en el artrósico. Al comparar ambos grupos, control y artrósico, por periodos, vimos menor expresión de TGFb tanto en el día 15 ( $p<0,01$ ) como en el 28 ( $p<0,01$ ).

La expresión de MMP3 y MMP13 fueron muy similares. Si bien en el grupo control, la MMP3 aumentó la expresión de forma progresiva, sin presentar diferencias significativas, en el grupo artrósico se mantuvo baja durante todo el proceso sin mostrar diferencias significativas. La expresión de MMP13 se mantuvo baja, tanto en el grupo control como artrósico, durante todo el proceso de diferenciación, sin mostrar tampoco diferencias. Al añadir líquido sinovial artrósico en el grupo control la MMP3 redujo, hasta 10 veces, de forma significativa la expresión ( $p<0,01$ ). Lo mismo ocurrió en el grupo artrósico pero sin encontrar diferencias significativas. En cuanto a la MMP13, al añadir líquido sinovial en el medio de cultivo del grupo control aumentó la expresión, hasta 8 veces, de forma significativa ( $p<0,01$ ). Al comparar ambos grupos, control y artrósico, no vimos diferencias en la expresión ni de MMP3 ni tampoco de

MMP13, tan sólo observamos menor expresión de MMP3 en el grupo artrósico en el día 28 ( $p<0,01$ ).

## DISCUSIÓN

---

La artrosis no se origina por un gen aberrante y no es la misma enfermedad en todos los pacientes. Es el resultado final de un proceso que evoluciona de la misma manera a partir de individuos y situaciones diferentes. Donde, además, por ser un proceso tiene una variable que es el tiempo. En este proceso intervienen tres conceptos que se interrelacionan: Biología, Mecánica y Estructura. La modificación o exceso de uno de estos tres elementos prolongado en el tiempo conlleva alteraciones en la estructura articular.

Hasta hace muy poco se pensaba que la artrosis consistía en una destrucción progresiva del cartílago articular mediada por distintos agentes enzimáticos, en una afectación del hueso subcondral sometido a una remodelación ósea con neoformaciones osteofitarias, esclerosis y quistes subcondrales y en una sinovitis asociada por afectación de la membrana sinovial. Sin embargo se ha visto que no son las únicas dianas que sufren el proceso degenerativo, ya que lo padecen todas las estructuras intraarticulares como ligamentos y meniscos. En nuestro estudio hemos medido expresiones de 6 factores: 2 anabólicos del hueso (OPG, PTH1r), otros 2 del cartílago (TGF $\beta$  y FGF2) y dos factores catabólicos (MMP3 y MMP13). Esta selección de factores se debe a que la artrosis es un proceso degenerativo multinivel, ya que

afecta al hueso subcondral, al cartílago, a la membrana sinovial (principal productor de líquido sinovial) y a la luz de los resultados de este estudio, también a la grasa de Hoffa, al haber realizado estas determinaciones a partir de condrocitos derivados de MSC procedentes de esta masa adiposa intraarticular.

El comportamiento de los factores anabólicos óseos es muy semejante, objetivando un aumento progresivo de su concentración en ambos grupos de estudio hasta la adición líquido sinovial. En este momento se produce una elevación exponencial de ambos factores en el grupo control y un descenso en el grupo de estudio de PTH1r y se mantiene en OPG.

Los agentes anabólicos condrales responden de manera similar en el grupo no artrósico a lo largo del proceso de diferenciación, objetivando un aumento progresivo de su expresión de manera significativa frente al grupo de estudio. Sólo la adición de líquido sinovial provocará alteración significativa en el grupo control, aunque de manera inversa, en la concentración de FGF2 de manera negativa y TGFb de manera positiva.

Las metaloproteinasas se comportan de manera diferente. En el caso de MMP3 se eleva su concentración en pacientes del grupo control. Sin embargo, en el grupo de estudio se mantiene constante. La adición de líquido sinovial descende su concentración en ambos grupos siendo muy llamativa en el grupo control. Es posible que la presencia de TIMPS en mayor concentración en el grupo control sea responsable de este comportamiento.

En el caso de MMP13, sucede como pasa en los factores osteogénicos, aumento progresivo en el grupo control incrementándose de manera muy notable con la adición de líquido sinovial. En el grupo de estudio, se

experimenta un descenso de la concentración de MMP13 al añadir líquido sinovial.

El aporte de líquido sinovial generalmente aumenta la expresión del factor en los grupos control, salvo FGF2 y MMP3, mientras que se inhibe o no aumenta la expresión en el grupo artrósico.

Esta situación podría llevar a plantearse dos hipótesis como posible explicación del fenómeno, si bien es cierto que tras revisar la bibliografía disponible en el momento actual, no se ha encontrado respaldo para ellas, y por tanto podría ser motivo de ampliación del estudio. La primera es que la presencia mantenida de determinados factores a lo largo del proceso degenerativo saturen los receptores de las células de pacientes artrósicos, mientras que las células de pacientes sanos aún no se han visto expuestas a dichos factores y por tanto muestren un aumento de la expresión al verse expuestos a líquido sinovial artrósico cargado de estos factores.

La segunda hipótesis se basaría en que las células degeneradas sean metabólicamente menos activas que las sanas, de esa manera les influya poco el medio en el que viven y por tanto no les afecte la adición de líquido sinovial artrósico.

De la fase preliminar de nuestro estudio se desprende que el líquido sinovial, aun en el caso de muestras procedentes de pacientes artrósicos, o a través de las sustancias que contiene, ejerce un papel protector frente a agentes dañinos. También llama la atención que los líquidos presentan comportamientos diferentes en función del paciente del que procedan, aunque el diagnóstico en ambos casos sea de artrosis primaria. Analizando los datos demográficos de cada paciente, en lo que se refiere a edad, sexo, IMC,

antecedentes personales, nivel de actividad, etc., no encontramos diferencias significativas entre ambos. Ejemplos como este, refuerzan la teoría de que la artrosis es un fenómeno degenerativo individualizado. Es decir, no hay 2 pacientes con artrosis iguales, lo que hace que tratar de diseñar un modelo clínico universal para el estudio de la misma, sea prácticamente imposible.

La aplicación clínica de nuestro estudio radica en que la artrosis es un proceso degenerativo y complicado que no puede ser comprendido como consecuencia de una alteración estructural o celular bien diferenciada. Por el contrario, son muchas las causas que intervienen y muchos los elementos que se ven alterados. Nuestro estudio ha demostrado que, además de lo ya conocido hasta el momento, hay estructuras extrasinoviales que también se ven alteradas como es, en nuestro caso, el paquete adiposo de Hoffa. Siempre se ha pensado que el paquete adiposo tenía una función mecánica pero con nuestro estudio podemos pensar que también puede servir como un reservorio de células mesenquimales (MSC) y que en momentos iniciales puede tener una función reparadora. Este trabajo nos abre nuevas líneas de investigación, pues seguimos trabajando para conocer cómo actúan las MSC tratadas con técnicas de bioingeniería y terapia génica sobre los procesos degenerativos iniciales. Pensamos que sería un proceso, sencillo y poco agresivo, de restaurar la función articular y de regenerar el cartílago alterado.

Las limitaciones de nuestro estudio han sido el escaso número de muestras empleadas, 6 del grupo artrósico y 6 del grupo control. Las determinaciones que hemos llevado a cabo son costosas y por tanto hubo una limitación económica a la ampliación del estudio que pudiera haber reflejado mayores diferencias con significación estadística donde hasta la fecha no las

hemos encontrado. Además, si el líquido articular artrósico tiene un papel protector, ¿cómo sería el líquido no artrósico?. Este dato no se ha podido comprobar ya que el volumen de líquido sinovial en pacientes sanos es escaso y difícil de extraer. También queremos resaltar que aunque hemos definido al grupo control como aquel compuesto por pacientes sin artrosis, los controles no son 100% sanos porque acuden a quirófano por dolor de rodilla aunque todavía no seamos capaces de diagnosticar cambios degenerativos y no estaría justificado éticamente. Por último, hemos de resaltar una limitación a todos los trabajos que versan sobre artrosis en clínica pues el diagnóstico se realiza de manera radiológica, ya que es el único método no invasivo validado. Tampoco las escalas de valoración tienen la sensibilidad y especificidad suficientes para encontrar diferencias y establecer grupos de trabajo. Por ello, hemos de tener presente la gran disociación entre el aspecto clínico, anatómico y radiológico que presenta la enfermedad. De ahí que no exista en la bibliografía un modelo clínico que sirva de manera fiable para el estudio de la artrosis, hasta tal punto, que algunos autores llegan a plantear la posibilidad de que cada paciente sufra “su” propia artrosis como proceso final de la interrelación personalizada de factores.

## CONCLUSIONES

---

Se confirma que el líquido sinovial de una rodilla artrósica contiene sustancias que pueden hacer de mensajeras y protegen los cultivos



condrocitarios derivados de la superficie condral expuestos a sustancias dañinas como el Etopósido.

Hemos demostrado que las células mesenquimales multipotenciales del paquete adiposo de Hoffa se diferencian a condrocitos, tanto si proceden de rodillas gravemente artrósicas (grupo estudio) como si proceden de rodillas sin artrosis (grupo control).

Los condrocitos derivados de células mesenquimales multipotenciales del paquete adiposo de Hoffa expresan factores anabólicos del cartílago (FGF-2 y TGFb) y del hueso (PTHr1 y OPG) así como catabólicos (MMP-3 y MMP-13) de manera diferente en ambos grupos. En todos los casos, en el grupo control hay una tendencia a que aumente la expresión en el día 28 de cultivo, mientras que no encontramos variaciones en el cultivo de condrocitos artrósicos.

La adición de líquido sinovial de pacientes artrósicos a cultivos condrocitarios procedentes de células mesenquimales pluripotenciales del paquete adiposo de Hoffa modifica la expresión de los factores en el cultivo de condrocitos controles (aumenta la expresión de OPG, PTH1r, TGFb, MMP13 y disminuye la expresión de FGF2 y MMP3) sin mostrar variaciones en los condrocitos artrósicos, salvo PTh1r que lo disminuye.

Este estudio demuestra que la artrosis grave en la articulación de la rodilla también afecta a las células mesenquimales del paquete adiposo de Hoffa, pudiendo contribuir al origen, instauración y progresión de la enfermedad.

# SUMMARY

---



## INTRODUCTION

---

The problems provoked by chondral lesions and their difficult treatment, which is due to the low reparative capacity of cartilage tissue, have been well known since ancient times. Nowadays there are many techniques which try to solve this huge problem, but some of them very complicated and expensive. The biggest difficulty we find when we treat osteoarthritic patients is acting in the earliest phases of this illness, when it is still reversible. This is the reason why we use unusual diagnostic tools as MRI (magnetic resonance imaging) or arthroscopy, in order to get the earliest diagnosis. Nevertheless, current scientific research tries to reach a preclinical diagnosis by looking at the cells and their molecules. Therefore, a number of growing factors, cytokines and MMPs have been discovered recently, but none of them has become the desired angular stone able to control the whole degenerative process.

At this point, we wonder what the role of the knee intraarticular structure but extrasynovial, known as Hoffa's fat pad is, which we know is full of MSC and biomarkers. However, its role as an arthritic modulator has not been studied well yet, neither in terms of the factors expressed during the differentiation process from MSC to chondrocytes nor in terms of the effect of the osteoarthritic synovial fluid over these cultures. Furthermore, as a preliminary phase of our investigation, we studied how cultures of mature chondrocytes act when are treated with synovial fluid from arthritic knees and its role against harmful substances such as Ethoposyde.

## MATERIAL AND METHODS

---

Twelve patients were chosen for this study. Six of them presented OA grade III or superior on Kellgren-Lawrence scale and were going to receive a knee arthroplasty (study group), while the other six patients were going to undergo surgery on their knees with a different diagnosis from OA (osteoarthritis) such as meniscal tear, ACL (anterior cruciate ligament) rupture or patellar malalignment (control group). Synovial fluid, Hoffa's fat pad and cartilage samples were taken from every patient.

The investigation was divided in 2 phases. Firstly, we studied the role that synovial fluid from OA (osteoarthritic) knees plays when used to treat chondrocytes cultures from OA knees. Secondly, we studied how cell cultures act during the differentiation process from Hoffa's fat pad MSC to mature chondrocytes (days 0,15,28) as well as after being treated with OA synovial fluid for 24 hours. We compared different biomarkers (OPG, PTH1r, FGF2, TGFb, MMP3 and MMP13) expressions in each period.

## RESULTS

---

During the first phase of the investigation, the number of dead chondrocytes was lower when we added OA synovial fluid after Ethopsyde than when this fluid was not used in chondrocyte cultures ( $p<0,05$ ). Nevertheless, these differences were not statistically significant ( $p>0,05$ ) between both groups, which shows its dependency upon the source of the fluid.

During the second part of the study, we saw that OPG and PTH1r expressions were similar during the first 28 days. These expressions were increasing from day 0 to day 28 ( $p>0,05$ ). We verified this fact in both groups of patients. When we compared both groups' expressions at each period, we found higher OPG in the control group expression in day 15 ( $p<0,05$ ) and lower in day 28 ( $p<0,05$ ) than the values of the study group for the same days. However, when we added OA synovial fluid, the control group suffered important changes, with OPG ( $p<0,001$ ) and PTH1r ( $p<0,01$ ) expressions increasing. No changes were found in the OA group.

FGF2 expression rose in the control group during the differentiation period without statistical significance ( $p>0,05$ ). In the meantime, no changes were found in the OA group. When the synovial fluid was added in day 28 in control group cultures, FGF2 expression decreased ( $p<0,01$ ), while the study group did not suffer any variations. When we compared FGF2 expression of both groups in day 15 and 28, it was found higher in control group ( $p<0,01$ ).

Control group's TGFb expression increased in day 15 and after the addition of synovial fluid ( $p < 0,05$ ). There were not differences in the study group. When we compared TGFb expression of both groups in day 15 and 28, it was found higher in control group ( $p < 0,01$ ).

MMP3 and MMP13 expressions were quite similar. MMP3 increased progressively during the first 28 days in the control group ( $p > 0,05$ ). The study group's expression kept without changes, showing low levels of MMP3. This later performance was very close to the one MMP13 showed during the differentiation process in both groups. When we added synovial fluid to the cultures in both groups, MMP3 expression decreased up to 10 times in the control group ( $p < 0,01$ ) and MMP13 expression increased up to 8 times in the same group ( $p < 0,01$ ). When we compared both groups during the differentiation process, we did not find significative differences between groups except in day 28, when the study group's MMP3 expression was lower than control group's one ( $p < 0,01$ ).

## DISCUSSION

---

Osteoarthritis does not develop from just one aberrant gene and it is not the same for each patient. Osteoarthritis is the end of a process that evolves the same way from different patients and situations. Since it is a process, the time variable is an important factor. During this process, there are three concepts that interrelate: Biology, Mechanics and Structure. The continuity in time of the modification or excess of one of these elements alters the whole joint structure.

Just a few years ago, there was the belief that OA consisted in progressive cartilage destruction caused by different enzymes. It was thought that subchondral bone was also affected through bony redesign with osteophytes, sclerosis and subchondral cysts, as well as synovitis as result of synovial layer damage. Nevertheless, it has been proved that other intraarticular structures like ligaments or meniscus are also affected during this degenerative process. In our investigation, we have measures of 6 factor expressions: 2 bony anabolics (OPG, PTH1r), 2 chondral anabolics (FGF2, TGFb) and 2 catabolic factors (MMP3, MMP13). We chose these factors because, as we saw before, OA is a multilevel entity, affecting subchondral bone, cartilage, synovial layer (main synovial fluid producer) and, as our study revealed, Hoffa's fat pad, since our determinations were based in chondrocyte layers from this adipose tissue's MSC.

Bony anabolic factors were quite similar. All of them increased progressively until we added synovial fluid. At this point, there is an exponential



increase in the control group while this expression decreases in the study group.

Chondral anabolic factors presented similar expressions. All of them increased progressively until we added synovial fluid, showing then big differences between both groups: it rises in the control group while it is reduced in the study group. When we added this fluid, FGF2 control group expression decreased while TGFb increased in the same group.

MMPs acted in a different way. MMP3 expression increases during the first 28 days in the control group while the study group does not suffer any changes. When we added synovial fluid, both groups MMP3 expressions decreased, but the control group in a much sharper way. We can think that aTIMP's higher concentration in the control group could be responsible for this important reduction.

When we analyze MMP13 expression, it increases progressively during the first 28 days until the addition of synovial fluid, when it starts rising rapidly in the control group while it decreases in the study one.

To summarize the effect of the OA synovial fluid, we can state that it increases the factors expression in the control group, except FGF2 and MMP3, while it decreases or does not affect the factor's expression in the study group.

We suggest 2 hypotheses to explain this phenomenon. There is not support from current scientific literature, so it could be part of a future investigation. On the one hand, we think that prolonged high level concentration of those factors during the degenerative process may saturate receptors from OA patients, whereas healthy patient's cells which have not still been exposed

to this factors can increase their expression when they are treated with OA synovial fluid.

On the other hand, the second hypothesis is based on the fact that OA cells are less active than healthy ones, so they might not be affected by the surrounding medium where they live, like treatment with synovial fluid.

The first phase of our study reveals that OA synovial fluid protects cartilage against harmful agents either by itself or by the different components found inside it. It is also surprising that synovial fluid acts in a different way depending on the patient it comes from, even if both patients share the same OA diagnosis. We analyzed demographic data from each patient and there were no differences. This example shows that OA affects each patient in a specific way. There are not 2 OA equals, so it is seems almost impossible to make a universal clinical model to study the OA origin or development.

The clinical application of our study is that OA is a degenerative and complicated process that cannot be understood as a well-defined cellular or structural change consequence. On the other hand, there are a lot of causes and a lot of altered elements. Our study shows that extrasynovial structures, such as Hoffa's fat pad in our case, are also altered during the degenerative process. It has been usually thought that this adipose tissue played just a mechanical role, but our investigation proves that it can also be a MSC's reservoir and, during the earliest stages of the degenerative process, it could repair some lesions. This essay opens our mind to new investigation lines, in order to know how exactly the MSC act when they are treated by

bioengineering procedures or genetic therapy over early stages of OA. It looks like a quite easy and an unaggressive way to restore the joint function and regenerate the damaged cartilage.

Our study limitations are the low number of patients we chose, 6 for each group. The laboratory experiments we performed being very expensive, there was an economic limitation to enlarge our study to reach more statically significant differences between groups. Furthermore, as we have seen, OA synovial fluid acts as a protector agent. We wonder what would have happened if we would have used a non OA fluid. We were not able to study non-OA fluid because its volume in healthy patients is very low and very difficult to take a sample from the knee. In addition, we defined the control group as patients not suffering from OA, but these patients are not 100% healthy, because they get into the OR due to knee pain, and they could already be suffering degenerative changes in their knees that we are still not able to diagnose. Finally, we should say that, as many other similar essays, we are limited by the only validated non-invasive method to diagnose OA, x-rays. Clinical scales have not enough sensibility or specificity to establish working groups or find differences. Thus, we should keep in mind the enormous clinical and radiological dissociation between clinical, anatomic and radiological aspects of this illness. Since there is not a valid clinical model in literature for OA study, some authors even think that each patient suffers his/her own OA.

## CONCLUSIONS

---

Synovial fluid from the OA knee contains different substances, which can act as messengers and protect chondrocyte cultures derived from articular surface exposed to harmful substances such as Ethposyde.

We have demonstrated that Hoffa's fat pad MSC are able to differentiate to chondrocyte, no matter their origin (OA or non-OA knees).

Those chondrocytes express anabolic chondral factors (FGF2, TGFb) as well as anabolic bony factors (PTH1r and OPG) and catabolic factors (MMP3 and MMP13) in different ways in both groups. In the control group, there is a tendency towards increasing expression during the first 28 days, while we cannot find any significant differences in the study group.

The OA synovial fluid addition to these cultures modifies the expression of these factors in the control group (increases OPG, PTH1r, TGFb, MMP13 and decreases FGF2 and MMP3), whereas no changes in the study group were found.

This study shows that severe OA also affects Hoffa's fat pad MSC, being able to contribute to the disease origin, establishment and progression.



# INTRODUCCIÓN

---



## SITUACIÓN ACTUAL DE LAS LESIONES CONDRALES

---

Desde la antigüedad es conocida la preocupación que ocasionan las lesiones condrales y su dificultad de tratamiento por el escaso poder reparativo que presenta el cartílago (1). Hoy día son muchas las técnicas, algunas de ellas de complejidad y coste muy elevados, que tratan de dar solución a esta problemática dando idea de la magnitud del escenario en el que hemos de actuar.

Los estudios epidemiológicos señalan que aproximadamente el 6% de los adultos tienen una afección degenerativa de la rodilla, porcentaje que aumenta al 10% en personas mayores de 65 años (2). Anualmente se realizan, en los Estados Unidos(3) unas 500.000 cirugías sobre el cartílago. Shelbourne et al. (4), en 2.270 reconstrucciones del ligamento cruzado anterior (LCA) encontraron 125 lesiones condrales articulares (Outerbridge tipo 3 y 4) con el menisco intacto. También se han encontrado este tipo de lesiones condrales articulares en el 23% de las lesiones agudas del LCA y en un 54% de las lesiones crónicas del LCA, con laxitud o inestabilidad (5)(6).Curl et al. (7), revisaron más de 31.000 artroscopias de rodilla y encontraron lesiones condrales en el 63% de los pacientes. Observaron además, que en los pacientes menores de 40 años, un 5% tenían una lesión condral grado 4 de Outerbridge en el cóndilo femoral interno. Hjelle et al. (8), evaluaron prospectivamente 1.000 artroscopias por lesiones osteocondrales y encontraron que un 61% de los pacientes tenían lesiones del cartílago con una extensión media de 2,1 cm<sup>2</sup>.



La frecuencia de las lesiones traumáticas del cartílago y lesiones osteocondrales en la población general es desconocida. La artrosis de cadera y de rodilla es el padecimiento más frecuente en la vejez, más que cualquier otra enfermedad en los EEUU (9)(10), y el 6% de los adultos mayores de 30 años con rodillas sintomáticas presentan signos radiográficos de artrosis. Granan et al. (11) analizaron, en el registro nacional noruego de lesiones de ligamento cruzado anterior (LCA), los pacientes intervenidos de una reparación primaria del LCA entre 2004 y 2007, y la relación de padecer una lesión de LCA asociada a lesiones de cartílago y de menisco. De un total de 3.475 pacientes, un 26% tenían lesiones de cartílago, un 47% roturas meniscales y un 15% presentaban ambas. Estos autores calcularon que la lesión del cartílago en una rodilla adulta aumenta un 1% por cada mes que transcurre desde que se produce la lesión hasta el día de la cirugía y, que las lesiones de cartílago son dos veces más frecuentes si hay una rotura meniscal y viceversa. En una revisión sistemática para determinar la relación entre gonartrosis y rotura o reparación del LCA, Higuchi et al. (12) analizaron en 7 estudios prospectivos y 24 retrospectivos, que la prevalencia de artrosis en pacientes con rotura aislada del LCA estaba entre 0% y 13%. Para los pacientes con rotura de LCA y lesión meniscal la prevalencia se situó entre 21% y 48% respectivamente.

En lo referente a las lesiones meniscales como causantes de lesión condral, hemos de tener en cuenta su gran prevalencia. En 2006, en Francia se realizaron 130000 cirugías por lesiones meniscales, siendo más frecuentes en varones que en mujeres (13).

La función que desarrollan los meniscos en la rodilla son: distribuir las solicitaciones mecánicas, estabilización mecánica, absorción de impactos y la

lubricación (14) aumentando con ello la congruencia articular y protegiendo al cartílago. Esta suma de labores que desempeña el menisco en la rodilla hacen que sea una pieza angular para el correcto funcionamiento de la rodilla, y es por ello que las lesiones meniscales se asocian con la aparición de lesiones condrales (15) y de cambios degenerativos.

Después de una meniscectomía total, el área de contacto articular disminuye entre un 50 % y un 70 %, aumentando entre dos y tres veces las solicitaciones en esa zona (16)(17), más significativas cuanto menores son las cargas. La meniscectomía parcial mejora estas cifras al reducir el contacto un 10% y aumentar un 65% las presiones (18). Voloshin y Wosk (19) demostraron que las rodillas sometidas a meniscectomía tienen un 20% menos de capacidad de absorción de impactos. Los cambios degenerativos irreversibles en el cartílago después de una meniscectomía se han demostrado en diferentes estudios clínicos (20)(21). La mayoría de los autores aceptan que la alteración de las condiciones mecánicas ya mencionadas dispara la cascada de procesos biológicos que degradan el cartílago articular, como son las metaloproteinasas de la matriz cartilaginosa que privan a los condrocitos de su capacidad de reparación y degradan la matriz extracelular. Por esto motivo, es de vital importancia tratar de reparar la mayor parte de las lesiones meniscales, si bien es cierto que sólo un porcentaje de pacientes seleccionados se benefician de estas técnicas.

El estudio de Fairbank en 1948 (22), demostró la importancia de estos fibrocartílagos en la función de la rodilla y los efectos degenerativos que se relacionan con su resección.

Andersson-Molina et al. (23) compararon pacientes sometidos a meniscectomía parcial vs total y no encontraron diferencias clínicas significativas a largo plazo. Sin embargo Hulet et al. (24) definieron un grupo de riesgo para esta técnica quirúrgica en el menisco externo como son: mujeres, mayores de 38 años, genu valgo e IMC elevado.

La artrosis primaria es la etiología más frecuente en la rodilla (67%), seguida de la cadera (58%) (25) y el tobillo (9%) que se encuentra muy por debajo de la etiología traumática. Este hecho nos hace pensar en las diferentes características anatómicas y biomecánicas del cartílago articular, en estos tres tipos de articulaciones.

Hasta mediados del siglo pasado, el abordaje terapéutico de las lesiones condrales se limitaba a una actitud expectante con medidas conservadoras que prolongaran la vida útil articular hasta finalizar el proceso en una artroplastia o artrodesis cuando la situación clínica lo requería. Sin embargo, fruto del conocimiento histológico y bioquímico articular, así como del diagnóstico por la imagen, en especial la RMN, existe, en la actualidad, un interés renovado en nuevas técnicas de reparación y regeneración tisular que impidan, o al menos, retrasen, la degeneración articular, permitiendo a los pacientes prolongar su vida activa, con buena calidad, hasta edades más avanzadas jamás esperadas en la antigüedad.

## CARTÍLAGO

---

El cartílago articular es un tejido elástico carente de nervios, vasos sanguíneos o linfáticos. Localizado en las diartrodias varía su grosor según las diferentes especies. El cartílago articular reduce la fricción, transfiere y distribuye las sollicitaciones en distintas posiciones articulares (26) y ofrece una superficie articular lubricada, que permite que los huesos se deslicen y giren uno sobre otro sin apenas desgaste.

El cartílago es un tejido duradero y resistente, sometido a un promedio de 10 millones de ciclos de carga articular por año (27). Macroscópicamente es blanco, brillante y firme. Se nutre del líquido sinovial, por un mecanismo de difusión que se realiza durante la carga articular. Clásicamente se divide en tres zonas, la capa superficial, la capa de transición media o radial y el cartílago calcificado. En cada una de ellas varían la estructura y composición, el volumen y la forma celular, el diámetro y la orientación de las fibras de colágeno, así como la concentración de proteoglicanos.

En la capa superficial del cartílago articular, las fibras de colágeno se disponen paralelas a la superficie articular para soportar las sollicitaciones de cizallamiento mientras que las capas más profundas, con una red de fibras de colágeno que proveen resistencia a la compresión y contribuyen a la cohesión del tejido, se atrapan a las grandes moléculas de proteoglicanos. En las regiones superficiales del cartílago los proteoglicanos están formados por los agregados más pequeños mientras que en las regiones profundas los forman tanto agregados grandes como pequeños. Para Treppo et al.(28) , la capa

superficial del cartílago articular es más blanda y elástica para soportar cargas y distribuir las solicitaciones y se divide, a su vez, en otras dos capas, una superficial o "*lámina splendens*", acelular, formada por un manto de fibras de colágeno finas y otra, más profunda, pobre en proteoglicanos pero con gran contenido de agua.

La zona de transición posee mayor espesor y sus fibras de colágeno adoptan una disposición con ángulos oblicuos que son de mayor diámetro que en la zona superficial. Hay menor número de fibras y agua que en la zona superficial.

La zona media o radial, contiene fibras de colágeno de mayor diámetro dispuestas de manera radial o perpendicular a la superficie articular. En esta zona la concentración de proteoglicanos es mayor y la de agua más baja que en las otras capas.

Por su parte, el cartílago calcificado es una capa delgada que separa el hueso subcondral del cartílago articular, constituida por condrocitos de pequeño tamaño, rodeados de cartílago calcificado.

El cartílago es un tejido de baja densidad celular, solamente un 3-10 % de su volumen está ocupado por condrocitos, por lo que el volumen de matriz extracelular que debe ser mantenido metabólicamente por un condrocito es elevada. El condrocito es una célula altamente diferenciada y especializada que deriva de células mesenquimales con capacidad limitada de proliferación y una vida media muy larga (29). Su tamaño, forma y, probablemente, actividad metabólica varían según las diferentes zonas del cartílago (27) y, aunque de apariencia simple, es capaz de vivir con tensiones muy bajas de oxígeno (29). Los condrocitos no tienen contacto entre sí, ni están vinculados con el exterior

por lo que se nutren con el líquido sinovial que debe atravesar una doble barrera, la membrana sinovial y la matriz extracelular.

Desde un punto de vista bioquímico, el cartílago articular es un tejido capaz de sintetizar y degradar constantemente todos los componentes de la matriz extracelular. Los mecanismos de acción de los factores de crecimiento y las interleuquinas (IL) potencian o inhiben la síntesis de los componentes de la matriz extracelular, y favorecen la actuación de moléculas que degradan el cartílago como son las proteasas o sus inhibidores tisulares. Por su parte, las extensiones citoplasmáticas de los condrocitos se proyectan hasta la matriz extracelular para segregar macromoléculas y proteger de los cambios mecánicos (30) (31) (32).

Las propiedades mecánicas del cartílago articular están relacionadas con la composición bioquímica y la permeabilidad del tejido. En la degeneración del cartílago se ha observado una disminución de su rigidez y un aumento de la permeabilidad (33). El cartílago articular y el hueso subcondral actúan como una unidad mecánica. La degeneración del cartílago articular se asocia con cambios en las propiedades mecánicas del hueso, especialmente en su rigidez y elasticidad (34). Las características del material cambian y el contenido de agua y la permeabilidad del tejido son más bajas (35). También se pierde la relación entre la resistencia del cartílago y del hueso subcondral. Ding et al. (36) vieron que las fisuras de la capa superficial del cartílago en los estadios artrósicos iniciales son el resultado de los daños sufridos en la red de colágeno y de la reducción en la rigidez del tejido. La delgadez del cartílago es uno de los datos iniciales de artrosis, que produce una rotura de las fibras de

colágeno (37) y, consecuentemente, de la unidad funcional del cartílago y hueso subcondral con una respuesta inferior a las cargas mecánicas.

La carga es necesaria para conseguir un cartílago morfológicamente normal; la inmovilización no favorece la regeneración del cartílago, al contrario, produce una atrofia del mismo con disminución de la concentración de glicosaminoglicanos siendo, por ello, el movimiento pasivo beneficioso (38). Las solicitaciones articulares deforman las células o sus cilios a expensas de crear gradientes de presión hidrostática, cambios fisicoquímicos o eléctricos, alterar el flujo del fluido tisular, de los nutrientes de los metabolitos celulares o por otros mecanismos (39). Los cambios en la presión hidrostática afectan al metabolismo de los condrocitos y modifican la estructura de los orgánulos intracelulares (40), posiblemente alterando la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (41) o el citoesqueleto (42). Un incremento en la carga mecánica, por encima del nivel fisiológico, induce cambios en el metabolismo del condrocito e inicia la degeneración del cartílago (43). Una diferencia regional en la respuesta de las citoquinas catabólicas, posiblemente, sea un factor de iniciación de la degeneración focal del cartílago en la artrosis (44). Otro factor de riesgo en el desarrollo de la artrosis es la edad. Estudios in vitro han demostrado que la actividad sintética de los condrocitos en el cartílago articular disminuye con la edad (45).

---

## DEGENERACIÓN ARTICULAR. ARTROSIS

---

Los primeros signos de degeneración del cartílago son la pérdida de proteoglicanos y el aumento de fluido. Según trabajos experimentales, los proteoglicanos son los responsables del comportamiento estático del cartílago a compresión, mientras que las fibras de colágeno se encargan de la resistencia a compresión y tensión del tejido, y el líquido intersticial tiene la función del comportamiento viscoelástico de tensión – relajación del cartílago (33).

El cartílago artrósico sintetiza colágeno tipo I en las fases finales de la degeneración (46) que se identifica con una transformación del cartílago en fibrocartílago. El colágeno tipo VI y XI también aumentan en las fases iniciales mientras que el tipo IX, sólo aumenta si el fibrocartílago está presente. Walker et al. (47) demostraron un aumento de síntesis de colágeno tipo X en los condrocitos aislados del cartílago articular lo que sugiere que su metabolismo está alterado.

En la artrosis se afectan las estructuras intraarticulares y finaliza con la pérdida del cartílago articular debido a una pérdida de la homeostasis entre los tejidos implicados. La investigación se ha centrado en factores que afectan al metabolismo del condrocito y en los mecanismos de degradación de la matriz cartilaginosa. Esto ha dado lugar a nuevos enfoques en la protección del cartílago, incluyendo el uso nuevos agentes que intervienen en el metabolismo óseo, anticuerpos inhibidores de enzimas que dañan el cartílago, y otros fármacos que inhiben los efectos deletéreos de las citoquinas (48). Además de



utilizar agentes que modifican el comportamiento del tejido original, otro área activa de la investigación se centra en el desarrollo de las técnicas del trasplante de cartílago. Estas técnicas fomentan el crecimiento y desarrollo de una matriz funcional de cartílago a través de la expresión o manipulación de un gen, o a través de la estimulación de determinadas citoquinas (48).

Interferir de alguna manera en la progresión del proceso artrósico ha demostrado ser un método eficaz para preservar la función articular. A las sustancias que protegen el cartílago articular durante el curso de la artrosis se les han llamado agentes condroprotectores mientras que cuando alteran el curso de la enfermedad se les denominan fármacos modificadores de las artrosis (DMOADs) (49).

Entre las técnicas quirúrgicas, algunas tienen un efecto condroprotector que estimula la regeneración articular, como son las osteotomías, al cambiar la dirección de las sollicitaciones articulares. Otras, tienen efectos menos claros como el lavado y abrasión articular, o la estimulación de la médula ósea por medio de perforaciones, microfracturas, la mosaicoplastia, los implantes sintéticos con diferentes biomateriales o los injertos osteocondrales. Estas técnicas buscan reemplazar el tejido dañado por otro en buenas condiciones o estimular la formación de una matriz extracelular adecuada a partir de las células pluripotenciales de la médula ósea. Por último, la ingeniería tisular es un campo que ha entrado en la cirugía de la reparación de las lesiones articulares por medio del implante de células, especialmente condrocitos autólogos. También se ha intentado aprovechar las técnicas artroscópicas para introducir sobre el cartílago lesionado los factores de crecimiento adecuados que ayuden la reparación del tejido o por medio de la terapia génica (50).

Este avance en el manejo de la patología degenerativa condral nos ha llevado a tener que definir de manera muy precisa el diagnóstico de la artrosis. Para ello se ha tomado la rodilla como la articulación de referencia por ser la más frecuentemente afectada de manera sintomática. La definición clásica descrita por Altman et al. (51) choca frontalmente con la corriente actual de tratamiento precoz de las lesiones condrales, ya que esta definición haría inviable una gran cantidad del armamento terapéutico del que podemos disponer hoy en día. Por ello, recientemente ha aparecido el concepto de artrosis precoz para poder dar respuesta a un gran número de pacientes muy activos que no quieren disminuir su nivel de actividad a pesar de padecer lesiones potencialmente devastadoras e irreversibles para cartílago articular de sus rodillas.

---

## RESPUESTA DEL CONDROCITO A LA LESIÓN ARTICULAR

---

Durante el desarrollo del cartílago, los condrocitos proliferan rápidamente mientras que en el cartílago articular maduro son pocos los condrocitos que presentan actividad mitótica aunque permanecen metabólicamente activos, sintetizando y degradando los productos de la matriz, con una actividad metabólica baja. En el cartílago maduro normal los condrocitos sintetizan macromoléculas que mantienen la matriz y pueden aumentar su tasa de síntesis ante una lesión o frente a cambios degenerativos pero, sin embargo, son incapaces de reparar defectos tisulares importantes.

Después de una lesión articular y, también, en los procesos degenerativos proliferan algunos condrocitos pero con una respuesta muy limitada y sin evidencia de que emigren a través de la matriz hasta la zona lesionada, de lo que se desprende que el tamaño de la lesión condral influye directamente en la reparación (52).

Los condrocitos son sensibles a los cambios estructurales de la matriz y a las demandas de carga de la superficie articular (27). La carga y el movimiento articular favorecen el metabolismo del cartílago articular, estimulando la síntesis de las macromoléculas estructurales mientras que la inmovilización articular prolongada o la falta de carga deterioran la superficie articular provocando la pérdida de proteoglicanos.

El cartílago es un material viscoelástico que se deforma al aplicar una sollicitación de carga constante con relación al tiempo que actúa. El cartílago es permeable, pues el agua fluye a través de él cuando se somete a un gradiente de presión, haciendo que el fluido salga del tejido. Existe una relación directa

entre la permeabilidad y el contenido de agua e inversa entre la permeabilidad y el contenido de proteoglicanos. Cuando desaparecen las cargas, el cartílago reabsorbe el fluido exudado y recupera sus dimensiones iniciales. Esta permeabilidad permite que se lleve a cabo parte del metabolismo de los procesos de reparación y degradación, actividad que se considera un proceso normal para mantener la arquitectura del cartílago articular.

El agua constituye hasta un 80 % del peso húmedo del cartílago y su relación con las macromoléculas de la matriz incrementa las propiedades mecánicas del tejido. El fluido tisular contiene gases, proteínas, metabolitos y una alta concentración de cationes que contrarrestan la carga negativa de los proteoglicanos. No es de extrañar que las propiedades mecánicas del cartílago articular estén relacionadas con la composición bioquímica y la permeabilidad del tejido.

Según Buckwalter (27) las alteraciones agudas que aparecen en el cartílago inmediatamente después de una lesión pueden ser consecuencia de la pérdida de macromoléculas de la matriz, sin daño celular, o del colágeno. La lesión crónica, por el contrario, produce una alteración mecánica celular, de la matriz cartilaginosa, y en estadios más avanzados también afecta al hueso subcondral.

---

## BIOLOGIA DEL CARTILAGO ARTICULAR

---

FACTORES DE CRECIMIENTO ANABÓLICO	CITOQUINAS CATABÓLICAS
<p>Funciones</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimulan la síntesis de matriz extracelular (PG, colágeno II, integrinas)</li> <li>• Estimulan la síntesis de TIMP</li> </ul>	<p>Funciones</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhiben la síntesis de matriz extracelular</li> <li>• Estimulan la síntesis de proteasas</li> </ul>
<p>Síntesis</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Extracartilaginosa</li> </ul>	<p>Síntesis</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Condrocitos, sinoviocitos, células inflamatorias</li> </ul>
<p>Ejemplos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• IGF-1 (aumenta la adhesión y el crecimiento condral)</li> <li>• TGF-<math>\beta</math>1</li> <li>• FGF-<math>\beta</math></li> <li>• EGF</li> <li>• BMP</li> </ul>	<p>Ejemplos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-1 (induce la degradación condral vía PGE2 y NO)</li> <li>• TNF-<math>\alpha</math></li> <li>• Interferón</li> </ul>

Tabla 1. Factores enzimáticos que intervienen en la homeostasis condral

## FACTORES DE CRECIMIENTO ANABÓLICO

---

El IGF-I es el principal factor anabólico en el líquido sinovial (53). Los condrocitos del cartílago articular expresan receptores para IGF-I fundamentalmente en las zonas media y profunda (54). Los IGF, especialmente el IGF-I, estimulan la síntesis de proteoglicanos, colágeno II e integrinas, a la vez que inhiben la destrucción de la matriz extracelular, tanto durante el desarrollo como en la vida adulta y favorecen la adhesión de los condrocitos a la fibronectina y al colágeno II (53).

Desde el punto de vista terapéutico, el IGF-1 favorece la cicatrización del cartílago, y en cultivos in vitro, la adición de IGF-1 al medio de cultivo ha demostrado mantener las propiedades mecánicas y electromecánicas del cartílago (55). Un efecto que también se ha mostrado por sobre-expresión de IGF-I en condrocitos usando técnicas de transferencia génica, es que la IGF-1 puede revertir los efectos inhibitorios de la IL-1 sobre la síntesis de los proteoglicanos (53).

La edad afecta tanto a los niveles circulantes de IGF-I, como a la sensibilidad de los condrocitos a IGF-I en el hombre (56). La pérdida del 50% de IGF-I entre la 3ª y 8ª década de la vida, afecta al soporte anabólico de estas células. Además, se ha descrito la reducción de un 30% de la capacidad de los condrocitos a reconocer y responder al IGF-I, con la edad. La edad es quizá el principal factor de riesgo de la artrosis, pero la IGF-I no muestra asociación con la incidencia o progresión de la artrosis. La reducción de los niveles circulantes de IGF-I observados con la edad, no es un factor de riesgo independiente para

el desarrollo de artrosis. Además de la edad, el estado nutricional es un factor determinante de los niveles de IGF-I (57,58)

Acosta et al. (59) demostraron que la proliferación de condrocitos jóvenes era significativamente superior a las células envejecidas y artrósicas ( $p < 0,05$ ). La proliferación entre los condrocitos envejecidos y artrósicos no varió de forma significativa. El tratamiento con distintos factores de crecimiento demostró que el FGF- $\beta$  y el IGF-1 potenciaron de forma significativa la tasa de proliferación celular de los tres grupos de condrocitos. La aplicación conjunta de FGF- $\beta$  y de IGF-1 estimuló significativamente más la proliferación celular que por separado.

Se ha visto que el TGF- $\beta$  estimula la síntesis de proteoglicanos en cartílago normal, y en cultivo de cartílago artrósico humano. Su acción está sujeta a la regulación por las citoquinas, incluida la IL-1 (60). En la artrosis, la respuesta de los condrocitos al TGF- $\beta$  parece estar aumentada. En el cartílago normal, el aumento en la síntesis de proteoglicanos se produjo tanto en las capas superficiales como profundas. En el cartílago artrósico, el aumento tuvo lugar en la capa más superficial. Estos datos sugieren que cuando el daño principal se produce en el cartílago superficial puede hacer a las células más sensibles al TGF- $\beta$ , mientras que los condrocitos de la capa profunda, intacta, no modifican su respuesta (61,62).

La mayor fuente de TGF- $\beta$  en el cuerpo está en el hueso. Utilizamos TGF- $\beta_1$  como referencia por su función más amplia. El TGF- $\beta_1$  actúa en numerosas actividades reguladoras sobre un amplio número de células e induce la síntesis de proteoglicanos específicos del cartílago y colágeno tipo II por las células mesenquimales. Tiene una fuerte acción antiinflamatoria, y está

implicado en el desarrollo de fibrosis en los procesos de inflamación crónica. Estimula la quimiotaxis hacia los fibroblastos y aumenta la expresión de colágeno, fibronectina y proteoglicanos. Además disminuye la actividad de las proteasas de la matriz extracelular y aumenta las actividades inhibitoras de proteasas, lo que resulta en una disminución de la degradación del colágeno. Estas acciones las hace potenciando la estimulación de síntesis del DNA por el FGF- $\beta$ , el factor de crecimiento epidérmico y el IGF-I. Además, ayuda a la formación de la TIMP y del inhibidor-1 del activador del plasminógeno, dos sustancias que pueden prevenir el efecto de degradación de la estromelisina y la plasmina.

### CITOQUINAS CATABÓLICAS

---

Las Interleuquinas con acción catabólica más importante o relevante en el cartílago articular son la IL-1, IL-6 y el TNF- $\alpha$  (63). La IL-1 es producida por los condrocitos y se relaciona con la destrucción del tejido cartilaginoso por lisis de la matriz, al acelerar la degradación de los proteoglicanos y disminuir los mecanismos de regeneración, inhibiendo la proliferación de los condrocitos y la síntesis de los proteoglicanos. Las articulaciones dañadas se caracterizan por aumentar sus niveles de IL-1 (64). Las concentraciones de IL-1 en el líquido sinovial aumentan en pacientes sometidos a una artroscopia con lesión meniscal entre 25 y 160  $\mu\text{g/ml}$  en las rodillas grado I y II, de la escala de valoración ICRS, y entre 40 y 175  $\mu\text{g/ml}$ , para las rodillas grado III y IV de la misma escala (65).



La elevación de los niveles intraarticulares de IL-1 induce muchos patrones catabólicos y suprime las vías anabólicas en las articulaciones (64). La IL-1 aumenta la producción de los mediadores inflamatorios, incluyendo la prostaglandina E2 (PGE2) y el óxido nítrico (NO), suprimiendo el colágeno y la síntesis de agregano, sobreexpresando las MMPs de la matriz y aumentando la liberación de proteoglicanos. La IL-1 se relaciona con la destrucción del tejido cartilaginoso por producir lisis de la matriz, al acelerar la degradación de los proteoglicanos y disminuir los mecanismos de regeneración, inhibiendo la proliferación de los condrocitos y la síntesis de los proteoglicanos (66).

La sobreexpresión de factores catabólicos como IL-1 y TNF- $\alpha$ , parece tener una función importante en la etiopatogenia del daño cartilaginoso (66). A su vez, el incremento de la IL-1 puede suprimir la biosíntesis de la matriz y aumentar la degradación enzimática de los tejidos articulares (67). Específicamente, la IL-1 aumenta la expresión y la actividad de las MMP en las células meniscales y en los injertos. Adicionalmente, la IL-1 dosis-dependiente, disminuye la resistencia de la reparación meniscal, suprime la superposición celular e inhibe la formación de tejido en la superficie meniscal de reparación. Es de mucho interés el hecho de que, una exposición aguda del tejido meniscal a la IL-1 durante 3 días, fue suficiente para suprimir la reparación tisular hasta las siguientes 4 semanas (68). Esta supresión de la resistencia meniscal por la IL-1 se correlacionó con un incremento de la actividad de las MMP.

El TNF- $\alpha$  in vivo, puede estimular la producción de IL-6 por los condrocitos (69), pero sus efectos sobre la proliferación y el metabolismo de los proteoglicanos en el cartílago articular es desconocido. Sabemos que sus niveles están elevados en el líquido sinovial de pacientes con artrosis y artritis

reumatoide y estimula la producción de enzimas proteolíticas, principalmente MMPs, e inhibe la síntesis de componentes de la matriz extracelular, permitiendo la degradación del cartílago (70).

El TNF- $\alpha$  muestra efectos sobre los condrocitos similares a los de la IL-1, incluyendo la estimulación de la producción de las proteasas que degradan la matriz y supresión de la síntesis de matriz cartilaginosa. La acción de estas dos citoquinas produce efectos sinérgicos. Además de los efectos catabólicos, la IL-1 y el TNF- $\alpha$  también afectan adversamente las actividades sintéticas de los condrocitos. Varios estudios han mostrado que el tratamiento con estas citoquinas, solas o en conjunto, inhiben la síntesis de proteoglicanos y de colágeno tipo II (71).

---

## METALOPROTEINASAS

---

Las MMPs son las principales enzimas para degradar los componentes de la matriz extracelular (72,73) y se han identificado a 20 miembros. Su actividad está controlada por unos inhibidores (inhibidores tisulares de las metaloproteinasas, TIMP) (60). Ambos, MMP y TIMP, son un factor importante en el proceso condrolítico que contribuye a los cambios degenerativos del cartílago (74–76) y son sintetizadas por los condrocitos y células de la sinovial (60,77).

Existen dos tipos de proteasas, implicadas en la regulación de la matriz, las metaloproteasas (colagenasa, estromelisina y gelatinasa), llamadas así por necesitar del zinc para realizar su función, sintetizadas en forma de proenzimas, y las catepsinas (B y D) con capacidad para degradar el agregado.

El bajo pH en el cual actúan las excluye de ser las causantes de la degradación de los proteoglicanos en la matriz intraterritorial.

La collagenasa, la estromelisina y la gelatinasa son sintetizadas en forma de proenzimas y requieren la activación extracelular mediante la modificación enzimática. La plasmina, producida a partir del plasminógeno, puede activar la collagenasa (78). La estromelisina puede superactivar a la collagenasa para llegar a su máxima actividad (79), aunque los mecanismos de activación de la estromelisina y la progelatinasa no han sido determinados. La acción de la collagenasa es muy específica, pues se trata de la única enzima capaz de separar, en una sola zona, la parte de la molécula de triple hélice de colágeno, a tres cuartas partes de distancia del extremo amino terminal de la molécula. Una vez que ha actuado la collagenasa, la gelatinasa separa las cadenas- $\alpha$  ya desnaturalizadas.

Las subclases de gelatinasas pueden ser divididas en gelatinasa A (MMP-2) y gelatinasas B (MMP-9), capaces de degradar colágenos tipo IV y V, elastina y gelatina (64,80,81). Las MMP son secretadas como precursores latentes y pueden ser activadas por proteólisis limitada (82). La MMP-1 tipo de membrana (MT1-MMP) es capaz de activar la forma latente de MMP-2 y MMP-13, y contribuir a la degradación de la matriz (83–85). Pocas MMPs son activadas intracelularmente y, por lo tanto, la mayoría de estas enzimas se activan cuando están en el espacio extracelular (65).

La estromelisina puede actuar tanto sobre el colágeno tipo II, en el dominio no helicoidal, como en el colágeno tipo IX (79,86) y se cree que una de sus principales funciones es la degradación de la proteína central del agregano. Sin embargo, a pesar de romper la proteína entre los dominios G1 y G2 (como

ocurre en la degradación normal del agregano), los productos específicos de la rotura identificados “in vivo” e “in vitro” no pueden atribuirse a la estromelisin.

En pacientes con artrosis y artritis reumatoide, se ha encontrado un aumento de expresión de MMP-1, 2, 3 y 13, en tejido sinovial y cartílago (61,63,87). Estas enzimas tienen una función clave en la remodelación del tejido conectivo normal y, por lo tanto, su liberación, activación e inhibición está estrechamente regulada (88–90).

En el cartílago articular normal, encontramos inhibidores de las proteasas, principalmente  $\alpha$ 2-macroglobulina, inhibidor del activador del plasminógeno y TIMP, por lo cual se ha llegado a considerar que una probable causa de artrosis sería el desequilibrio entre los factores activadores e inhibidores de las proteasas.

## LÍQUIDO SINOVIAL

---

En la rodilla humana hay entre 1 a 5 ml de fluido sinovial, que es un dializado del plasma claro, o ligeramente amarillento, viscoso, secretado por la membrana sinovial y que, en condiciones normales, no contiene factores de coagulación, eritrocitos, ni hemoglobina. Sin embargo, presenta hialuronato, un glicosaminoglicano extendido, y una glicoproteína lubricante que reducen la fricción. Su función difiere según las circunstancias, aunque interviene en la lubricación articular (91).

Con el avance de la biología molecular se han ido definiendo distintos patrones de expresión de proteínas en el líquido sinovial y en relación con la artrosis. Estas proteínas que regulan las interacciones con las células del sistema inmune son las citoquinas. Están implicadas en la inflamación y daño articular, por ello su concentración en el líquido sinovial varía según el estado de la articulación. Las principales citoquinas intraarticulares que han recibido especial atención en el contexto de la inflamación articular incluyen las interleuquinas (IL)-1, -6 y -8, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), y el factor de granulocitos y macrófagos estimulante de colonias (GM-CSF). Tanto la interleuquina IL-1 y el TNF- $\alpha$  tienen una importancia adicional, ya que pueden provocar efectos directos condrodestructivos que son independientes de sus propiedades antiinflamatorias. Es decir, median la pérdida de cartílago, tanto mediante el aumento de las actividades catabólicas de los condrocitos articulares, como por la inhibición de las actividades anabólicas de estas células (92). Igualmente existen otros factores anabólicos como el factor de crecimiento derivado de la insulina (IGF) y el factor de crecimiento tisular- $\beta$

(TGF- $\beta$ ), que también se expresan en el líquido sinovial, y por lo tanto podemos analizar. La medición del balance anabólico - catabólico del líquido sinovial, traduce el ambiente y el estado de las estructuras a las que baña.

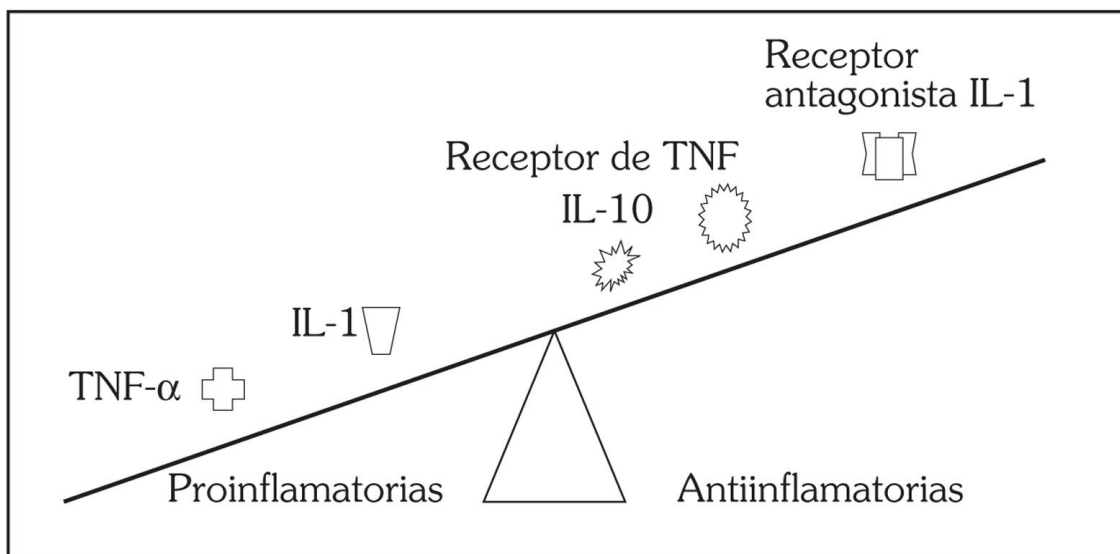


Fig. 1. Equilibrio de citoquinas proinflamatorias/antiinflamatorias. Adaptada de Feldman M et al. (93)

## CÉLULAS MESENQUIMALES

---

### BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES

---

Las células troncales son un tipo de células presentes en el organismo con una especial capacidad de autorreplicación, proliferación y diferenciación hacia células de otros tejidos. Estas células se distinguen por una serie de características fundamentales. Son capaces de renovarse a sí mismas por medio de división celular incluso después de períodos largos de inactividad. Otra característica fundamental es que bajo determinadas condiciones fisiológicas o experimentales pueden diferenciarse hacia células de tejidos u órganos con funciones específicas.

Cuando una célula troncal se divide, lo hace de forma asimétrica, es decir, da una célula troncal genéticamente similar a la inicial (clonogenicidad) y otra célula con una función más especializada dependiendo del tejido donde se encuentre. Este último proceso se conoce como “diferenciación”. Estas características les confieren la capacidad de mantener o reparar los diferentes tejidos y órganos en los que se encuentran.

Dependiendo de su procedencia las células troncales se dividen en células troncales embrionarias (CTE) o células troncales somáticas (CTS). Las células troncales embrionarias son células pluripotentes procedentes de embriones en fases tempranas del desarrollo. Las células troncales somáticas, también llamadas células troncales del adulto, son células presentes en diferentes tejidos del organismo y presentan capacidad multipotente. El término multipotente indica la capacidad de éstas células para dar lugar sólo a unos

determinados tipos de células de diferentes tejidos, generalmente limitados a los derivados de la capa embrionaria de la que proceden o los tipos celulares presentes en el órgano en que se encuentran. En cambio, el término pluripotencia hace referencia a la capacidad para dar lugar a todos los diferentes tipos celulares del organismo.

	VENTAJAS POTENCIALES	PELIGROS Y OBSTÁCULOS
<b>MSC</b>	Conocidas y caracterizadas	Potencial proliferativo limitado
	Morfología celular adaptada a un tejido	Capacidad diferenciación restringida
	Riesgo teratómico bajo	Morfología celular adaptada a un tejido
	Fáciles de expandir y cultivar	Bajo nivel telomerasas
	Moderan sistema inmunológico	Apoptosis temprana
	Propiedades immuno-privilegios	Moderan sistema inmunológico
<b>iPSC</b>	Posibilidad de reclutar células endógenas	Población muy heterogénea
	Pluripotentes	Riesgo formación teratoma
	Potencial proliferativo ilimitado	Poco conocidas
	Fuente autógena	Reprogramación poco efectiva
	No reacción inmunológica	Memoria epigénica de la célula original
	Nivel telomerasas alto	Expansión muy larga

Tabla 2. Propiedades de las células mesenquimales (MSC) y de las células mesenquimales pluripotenciales inducidas (iPSC) (Tomado de Augustynyak et al. (94) )

Las iPSC tienen capacidad de diferenciarse en derivados de las tres capas primarias embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo). La mayoría se originan de los fibroblastos y se desarrollan reprogramándolas con una expresión forzada de los factores de transcripción Sox2, Oct3/4, Klf4 y Myc en células somáticas



Diversos estudios han demostrado la presencia de células troncales somáticas en diferentes tejidos del organismo humano: médula ósea, grasa, hueso, cartílago, etc. Las CTM son un tipo de células troncales somáticas presentes en el estroma de diferentes tejidos del organismo, aunque se encuentran predominantemente en el estroma de la médula ósea. El gran interés que existe por estas células proviene de su capacidad para diferenciarse hacia tejidos como grasa y tejido conectivo, tejidos del sistema musculoesquelético como hueso, cartílago y tendón, y recientemente se ha demostrado su gran plasticidad al observar capacidad incluso para diferenciarse hacia células de músculo liso, cardiomiocitos e incluso tejido neural. La plasticidad celular se define como la capacidad de una célula para diferenciarse a tipos celulares diferentes de su tejido de origen, o incluso de una capa embrionaria diferente. Así mismo estas células presentan efectos locales regulando el microambiente que las rodea mediante efectos paracrinos e incluso inmunomoduladores. Estas propiedades les otorgan un gran valor como alternativa al uso de las células troncales embrionarias.

En el origen de estas células cabe destacar a Alexander Friedenstein (93) como descubridor de las unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F). En 1980, Owen y Ashton (94) demostraron que estas colonias de fibroblastos eran capaces de generar hueso, cartílago y tejido conectivo en un estudio *in vivo* al ser implantadas en cámaras de difusión en peritoneo de conejos.

En 1988 un estudio conjunto de Owen y Friedenstein (95) propuso por primera vez la posibilidad de la existencia de una célula troncal en el estroma de la médula ósea diferente a las ya conocidas células troncales

hematopoyéticas. El término que emplearon para denominarla fue “célula troncal estromal”. Caplan (96) fue el primero en acuñar el término “célula troncal mesenquimal” en la década de los 90. Fue uno de los primeros autores en conseguir cultivar y trasplantar éstas células en humanos y observar la formación de hueso producida por éstas células mediante un método para la obtención y cultivo diferente. Desde entonces la investigación de las células troncales mesenquimales en humanos ha ido cobrando un gran auge. Los métodos para el cultivo de estas células, así como los criterios que se han empleado para definirlas, han ido variando en el tiempo conforme los estudios de diferentes autores han ido arrojando nuevos datos. De esta manera, en el año 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) (97) anunció en una publicación la definición y requisitos mínimos que debe cumplir una célula para poder ser considerada célula troncal mesenquimal. Estos requisitos consisten en la capacidad para adherencia al plástico, la expresión de CD90, CD105 y CD73, la ausencia de antígeno humano de histocompatibilidad (HLA-DR) y marcadores de células hematopoyéticas (exceptuando CD90), y la capacidad de diferenciación hacia grasa, hueso y cartílago.

## DIFERENCIACIÓN HACIA CARTÍLAGO

---

La diferenciación hacia cartílago ha sido bien demostrada *in vivo* tanto en animales como en humanos. No obstante, el descubrimiento de una técnica para conseguir esta diferenciación *in vitro* ha sido un reto importante para los investigadores.

Las CTM al ser cultivadas en presencia de Dexametasona presentan diferenciación hacia cartílago de un bajo número de las células presentes en el cultivo. El tejido resultante demuestra una pobre calidad, presentando características más propias de fibrocartílago que de cartílago hialino maduro. Al añadir TGF- $\beta$ 1, la tasa de diferenciación aumenta y se observa una mayor presencia de colágeno de tipo II. Así mismo, la presencia de azúcares simples, BMP-2, ácido retinoico (Vitamina A) y colágeno de tipo I también son factores que promueven la diferenciación condral de las CTM.

Fase	Evento	Nivel molecular
<b>Origen mesenquimal</b>	Reclutamiento, proliferación condensación MSC  Fibronectina  N-caderina  Colágeno 1, -3, -5  Tenascina	<b>TGFb</b> , Wnt-3a, Wnt-4a, Wnt-7a, <b>FGF2</b> , FGF-4, FGF-8, FGF-10, BMP-2, BMP-4, BMP-7, Sonic Hh
<b>Condrogénesis temprana</b>	Proliferación condroprogenitores y diferenciación de condroblasto a condrocito  Fibronectina  Colágeno 2A  Hialurónico	IGF-1, FGF-2 / FGFR-2, BMP-2, BMP-4, BMP-7, GDF-5
<b>Condrogénesis avanzada</b>	Diferenciación final  Condrocitos maduros  Fibronectina  Colágeno 2B, 9, 11  Agrecano  COMP	FGF-18, FGFR-3, BMP-2, BMP-7, Ihh, <b>PTH1-r</b>
<b>Hipertrofia</b>	Condrocitos pre- hipertróficos e hipertróficos  Fibronectina  Colágeno 10  <b>MMP-13</b>  Fosfatasa alcalina	VEGF, Wnt-14, FGF-2, FGF-18, FGFR-1, GDF-5, BMP-2, BMP-6
<b>Osificación</b>	Invasión vascular y calcificación matriz cartílago  Reemplazo cartílago zona hipertrófica por hueso  Fibronectina  Colágeno 1  Osteocalcina	Balance entre factores anabólicos y catabólicos

Tabla 3. Fases más importantes de la condrogénesis (Tomado de Augustynyak et al. (94))

En negrita y cursiva factores estudiados en nuestro proyecto. Las líneas discontinuas muestran un paso continuo del proceso, sin interrupción. La doble línea muestra separa la osificación como un proceso independiente que no está involucrado en la formación de la articulación

Pittenger y colaboradores (98) en 1998 describieron una técnica eficaz para inducir *in vitro* la diferenciación hacia condrocitos de CTM. Demostraron que la utilización de TGF- $\beta$ 3 presenta mejores resultados que el uso de TGF- $\beta$ 1. Así mismo observaron que el cultivo de las células en medios con suero inhibía la transformación de las células. En su trabajo describen un novedoso método de cultivo tridimensional, realizando microagregados celulares (pellet) mediante centrifugación y cultivándolas en medios exentos de suero y con adición de inductores de la condrogénesis. De esta forma se obtiene un tejido de cartílago con una estructura más parecida al presente en el organismo vivo, porque favorece la adherencia y las interacciones célula-célula. Otros factores externos como la aplicación de presión hidrostática cíclica también han demostrado efectos positivos en la inducción de las CTM hacia cartílago.

## CAPACIDAD INMUNORREGULADORA

---

Una de las capacidades más sorprendentes de las CTM es la de poder escapar al reconocimiento del sistema inmune y que pueden inhibir respuestas inmunitarias. Diversos estudios indican que el inmunofenotipo de las CTM, la baja expresión de antígeno humano leucocitario (HLA), antígeno humano de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) y la ausencia de moléculas coestimuladoras, junto con la observación de que no producen una respuesta proliferativa de linfocitos alogénicos, sugiere la baja inmunogenicidad que presentan las CTM (99).

El efecto inmunosupresor de las CTM se realiza fundamentalmente por medio de la secreción de factores solubles externos. Entre estas moléculas las más importantes son la IDO (Indolamina 2,3-Dioxigenasa) que inhibe la formación de productos citotóxicos, y la Prostaglandina E2 (PGE2), que actúa inhibiendo la proliferación de células T y su producción de IL-2. La IL-6 producida por las CTM inhibe la diferenciación de monocitos a células dendríticas (presentadoras de antígenos), y en consecuencia disminuye la estimulación de células T. Así mismo, retrasa la apoptosis de neutrófilos y linfocitos, permitiendo así una mayor cantidad de células disponibles en casos de infección (100).

## “HOMING”

---

“*Homing*” (del inglés *home*: hogar) hace referencia a la característica de una célula para migrar a un tejido específico. La célula reacciona frente a unas moléculas llamadas quimiocinas moviéndose en un sentido u otro según el gradiente de concentración de éstas moléculas. Este proceso se conoce como quimiotaxis. Las CTM presentan una variedad de quimiocinas (CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5, y CXCR6), receptores quimiotácticos y moléculas de adhesión que les confieren capacidad para ser movilizadas de su tejido de origen y migrar a otros tejidos (101).

Se ha demostrado que las CTM aparecen en tejidos dañados con inflamación. Se ha observado en diferentes estudios que tras infusión intravenosa de CTMs estas células migran a músculo miocárdico infartado, médula ósea, tejido nervioso y grasa de Hoffa.

---

## EFFECTOS DE LA EDAD Y FACTORES EXTERNOS SOBRE LAS CTM

---

Stenderup y colaboradores (102) demostraron que el número de CTM no disminuye con la edad, así como su capacidad replicativa. En un estudio posterior estos mismos investigadores observaron disminución del período vital y mayor senescencia de las CTM relacionado con la edad. La capacidad de diferenciación condrogénica se mantiene constante con la edad mientras que la capacidad para diferenciación adipogénica, osteogénica y neurogénica disminuye con la edad.



---

## FUENTES PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES

---

La fuente más común para la obtención de células troncales mesenquimales es la médula ósea localizada en el hueso esponjoso. Tradicionalmente se ha considerado la médula ósea de cresta ilíaca como la más efectiva para la obtención de CTM (103).

En la última década se ha generado una enorme expectativa por el tejido adiposo, dado que diversos estudios han demostrado la presencia de CTM en este tejido con similares características las obtenidas de médula. La técnica para la obtención de tejido graso incluye métodos como el lipoaspirado o el empleo de tejidos desechados tras actos quirúrgicos. Hasta la fecha se han encontrado pequeñas diferencias en el fenotipo, aunque no existen evidencias claras que muestren la superioridad de una fuente frente a la otra. Actualmente ambos métodos se encuentran bien estandarizados en humanos y cuentan con numerosos estudios que avalan su utilidad en terapia celular.

---

## INDUCCIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN HACIA GRASA, HUESO Y CARTÍLAGO

---

Como se ha mencionado, un requisito imprescindible en la identificación de las CTM es demostrar su capacidad de diferenciación como mínimo hacia osteoblastos, condroblastos y adipocitos. Esto se consigue mediante el cultivo de las CTM en presencia de factores que inducen la diferenciación hacia una u otra línea celular. El éxito de la diferenciación es generalmente demostrado mediante la tinción de las muestras y su visualización al microscopio (104). Las tinciones deben ser específicas para cada tipo de diferenciación, y permitir la identificación de las características que permiten confirmar la transformación de las células (morfología celular, presencia de productos generados por las células diferenciadas en su interior o en la matriz extracelular).

---

## USOS TERAPÉUTICOS DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES

---

El gran interés que han generado las CTM se debe a su capacidad para diferenciación hacia diferentes tejidos, lo que las hace especialmente útiles en tratamientos con fines de reparación o regeneración de tejidos dañados (105). Se ha descubierto que además de dichas propiedades poseen una mayor plasticidad de la esperada, con capacidad incluso para diferenciarse hacia tejidos de capas embrionarias diferentes de la que proceden.

Las células progenitoras encontradas en las fases iniciales del embrión en desarrollo y las células progenitoras procedentes de cordón umbilical o placenta, presentan un gran atractivo para el tratamiento de diversas patologías. No obstante sus métodos para la obtención y la naturaleza de estas células plantean fuertes dilemas éticos. El descubrimiento de las capacidades de las CTM del organismo adulto ha presentado una alternativa eficaz por sus menores compromisos éticos, facilidad de obtención y mejor comprensión de su biología. Esto ha permitido un gran avance en los últimos años, que se ha visto reflejado en un aumento importante de los estudios publicados en cuanto a terapia celular mediante el uso de CTM (enfermedades cardiovasculares, sistema nervioso central, aparato locomotor, enfermedades hepáticas o trasplantes) (106).

## PAQUETE ADIPOSEO DE HOFFA

---

La almohadilla grasa de Hoffa o formación adiposa subrotuliana de Vallois es parte del paquete adiposo anterior de la rodilla. Fue descrita por primera vez por Albert Hoffa en 1904 (107). Es una masa grasienta densa de configuración piramidal con base anterior situada detrás de la porción no articular de la cara posterior de la rótula y tendón rotuliano y encima de la superficie preespinal de la tibia y vértice interno en proximidad o contacto con los ligamentos cruzados e inserciones anteriores meniscales (108). La plica infrapatelar o ligamento mucoso discurre desde la escotadura intercondílea hasta la grasa de Hoffa paralela al LCA (109). Está recubierta por un tejido fibroso y la membrana sinovial de forma que se considera intraarticular pero extrasinovial.

Su irrigación se debe a las ramas terminales de las arterias geniculares superior e inferior. La innervación es muy rica con terminaciones nerviosas tipo IVa que son estructuras no corpusculares relativamente mal diferenciadas, formadas por filamentos amielínicos dependientes de los nervios tibial, safeno, obturador interno, peroneo común, vasto lateral y peroneo recurrente (108).

Parece que el papel de la grasa de Hoffa no se limita sólo a una función nutricional. En algunos estudios relacionados con la cirugía del ligamento cruzado anterior se ha estudiado esta estructura, señalándose su papel en la nutrición y aporte vascular de los injertos (110,111) y su valor para la sinovialización del injerto. Pero además cumple una función mecánica en la distribución del líquido sinovial y en la absorción de cargas. Por otro lado,

posee en su interior células capaces de modificar la degeneración artrósica de la rodilla, como órgano endocrino, con liberación de mediadores inflamatorios, tales como: citoquinas, interleuquinas (1, 4, 6, 8, 10, TNF), factores de crecimiento (VEGF, FGF2) y adipocinas (leptina, adiponectina).

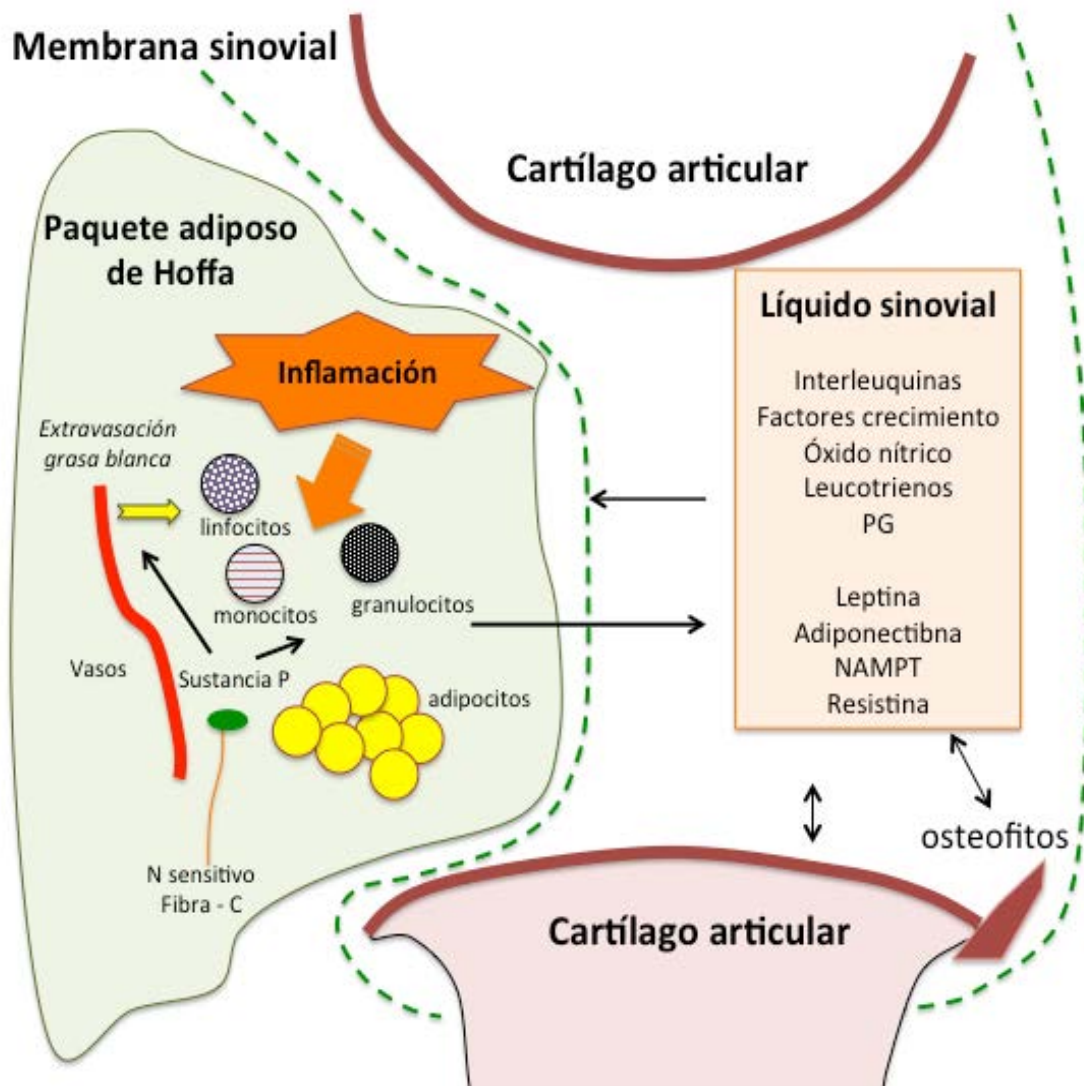


Fig. 2. Papel de la grasa de Hoffa en la degeneración articular y su relación bioquímica con el líquido sinovial. Adaptado de Clockaerts S. et al. (130)

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



## HIPÓTESIS

---

Las células mesenquimales (MSC) del paquete adiposo de Hoffa son células extrasinoviales y, por lo tanto, no están en relación con el cartílago articular.

Nuestra hipótesis de trabajo es que el líquido sinovial contiene elementos, no todos conocidos, que sirven de mensajeros y alteran el metabolismo de los componentes celulares articulares, incluyendo las células mesenquimales del paquete adiposo de Hoffa.

La hipótesis nula es que el proceso degenerativo articular no afecta a las estructuras ni células extrasinoviales, como sería el caso de las MSC del paquete adiposo de Hoffa.

## OBJETIVOS

---

Para demostrar la hipótesis nos hemos trazado los siguientes objetivos:

- I. Estudiar el papel del líquido sinovial artrósico sobre la proliferación y la supervivencia de cultivos de condrocitos de la superficie articular ante agentes dañinos como el Etopósido (ETO).
- II. Caracterizar la diferenciación a condrocito de las MSC obtenidas del tejido adiposo de Hoffa de pacientes con artrosis



grave de rodilla (grupo estudio) y de pacientes sin artrosis (grupo control).

- III. Estudiar la expresión de factores anabólicos del cartílago (FGF-2 y TGFb) y del hueso (PTHr1 y OPG), así como catabólicos (MMP-3 y MMP-13) durante este periodo de diferenciación de las MSC procedentes del paquete adiposo de Hoffa de ambos grupos.
- IV. Comparar la expresión de estos mismos factores por parte de los condrocitos diferenciados a partir de células mesenquimales del paquete adiposo de Hoffa de ambos grupos a los 28 días tras añadir, en el medio de cultivo, líquido sinovial de una rodilla gravemente artrósica (grado III o superior según la escala de Kellgren-Lawrence).

# MATERIAL Y MÉTODOS

---



## DISEÑO DEL ESTUDIO

---

El estudio se dividió en dos fases. Una fase preliminar en la que se estudió el papel ante agentes dañinos del líquido sinovial para cultivos de condrocitos a partir de cartílago articular maduro de rodillas artrósicas. En una segunda fase se comparó el comportamiento de las CTM de grasa de Hoffa diferenciadas a condrocitos en distintas fases de su cultivo, así como su respuesta diferencial ante el líquido sinovial artrósico.

Para ello se diseñó un estudio prospectivo no aleatorizado ni cegado con dos grupos de pacientes.

En todos los pacientes se tomaron muestras de líquido sinovial, grasa de Hoffa y cartílago.

El estudio se realizó en el Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. La extracción de las muestras se realizó en quirófano durante el procedimiento quirúrgico que motivó la intervención quirúrgica (ver criterios de inclusión), y el procesamiento de las muestras fue realizado en el Laboratorio del IMMA de la Facultad de Medicina de la Universidad San Pablo CEU de Madrid, Campus de Montepríncipe (Madrid).

El estudio contó con la financiación económica de la V Beca de Investigación a la condroprotección otorgada en el seno del 48 congreso de la SECOT en Oviedo (2011) (anexo III).

Dicho estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica–Área 1 el día 14 de junio de 2011 (anexo I), certificando que dicho estudio:

- Se plantea siguiendo los requisitos legalmente establecidos y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado (anexo II).
- La capacidad del investigador, sus colaboradores y las instalaciones y medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Además el citado CEIC cumple las normas BPC (CPMP / ICH / 135 / 95).

---

## SELECCIÓN DE PACIENTES

---

Se definieron dos grupos de pacientes en función del diagnóstico de artrosis de rodilla.

Para el diagnóstico de la artrosis utilizamos radiografía simple en carga de la articulación a ser intervenida, rodilla, en proyección antero-posterior tomada con un margen no superior a 6 meses previos a la toma de muestras.

Para el diagnóstico de la artrosis y diferenciación de los grupos de estudio recurrimos a la definición clásica de Altman et al. (51), el ACR en 1986, y avalada por la SER es: presentar en rx estándar, antero posterior de rodilla, una degeneración articular mayor o igual un grado II de Kellgren y Lawrence, o lo que es lo mismo, presentar, al menos, osteofitos definidos y, además,

cumplir uno de los tres siguientes supuestos: ser mayor de 50 años, rigidez menor de 30', crepitación. En nuestro estudio para disminuir la variabilidad interobservador que presenta dicha clasificación, optamos por utilizar como punto de corte, el estadio III o superior de degeneración articular según Kellgren y Lawrence (112).

Para clasificar el grado de artrosis y así diferenciar los grupos recurrimos a la graduación estandarizada de Kellgren y Lawrence.



Tabla 4. Clasificación de Kellgren y Lawrence

A. Estadio I: osteofitosis. B. Estadio II: estrechamiento de interlínea.

C. Estadio III: esclerosis subcondral. D: Estadio IV: deformidad

El primer grupo lo constituyeron pacientes con artrosis avanzada.

El criterio de inclusión específico de este grupo es:

- Pacientes con al menos un grado III en la escala de K-L que estuvieran en lista de espera para realización de artroplastia total de rodilla con diagnóstico de gonartrosis primaria.

El grupo control lo constituían pacientes sin diagnóstico de artrosis

El criterio de inclusión específico de este grupo es:

- Pacientes que se iban a someter a una intervención en la rodilla de causa no degenerativa: reconstrucción de LCA, meniscopatía, mal alineación femoropatelar, etc. que no presentaban fenómenos degenerativos articulares, grado 0 de K-L (no cambios degenerativos radiológicos).

En todos los casos los pacientes los pacientes debían cumplir:

- La mayoría de edad
- No haber sido intervenidos de la rodilla a estudiar
- No padecer enfermedades inflamatorias
- No tomar corticoides de manera sistémica
- No tomar tratamientos inmunomoduladores
- No tener hábitos tóxicos (tabaquismo, alcoholismo, etc.)
- IMC menor de 35
- Dar consentimiento firmado de la autorización para la toma y procesado de muestras procedentes de sus rodillas intervenidas

Se tomaron muestras de 6 pacientes con diagnóstico de artrosis y de 6 pacientes sin artrosis establecida. Los líquidos sinoviales que se utilizaron en la fase preliminar del estudio corresponden a los pacientes 02 (LSV02) y 03 (LSV03) de la tabla 5. El líquido sinovial que se utilizó en la fase final del

estudio procedía de uno de los pacientes con artrosis utilizado en el grupo de estudio (paciente nº 02 de la tabla 5) (LSV02).

Nº	Sexo	Edad	IMC	AP	DX
<b>paciente</b>					
1	♂	81	31,9	PTR	GONARTROSIS
2	♀	63	30,7	DM, HIPOTIROIDISMO	GONARTROSIS
3	♀	80	32,5	HTA	GONARTROSIS
4	♀	71	28,9	PTC	GONARTROSIS
5	♀	55	33,9	HTA, DM, DL	GONARTROSIS
6	♀	60	34,8	DM, HTA, HIPOTIROIDISMO	GONARTROSIS

Tabla 5. Datos epidemiológicos de los pacientes del grupo de estudio con artrosis



Nº	Sexo	Edad	IMC	AP	DX
<b>paciente</b>					
7	♂	50	26,5	SIN INTERÉS	ROTURA MENISCO INTERNO
8	♂	21	20	SIN INTERÉS	ROTURA LCA
9	♂	38	24	SIN INTERÉS	ROTURA MENISCO EXTERNO
10	♂	32	26	SIN INTERÉS	INESTABILIDAD FEMORO- PATELAR
11	♂	51	25,5	DM, DL	ROTURA MENISCO INTERNO
12	♂	47	28	HTA	ROTURA DE MENISCO INTERNO

Tabla 6. Datos epidemiológicos de los pacientes del grupo de estudio sin artrosis

Nº	Sexo	Edad	IMC	AP	DX
<b>paciente</b>					
01	♂	81	31,9	PTR	GONARTROSIS
02	♀	78	28,7	SIN INTERÉS	GONARTROSIS
03	♀	80	32,5	HTA	GONARTROSIS

Tabla 7. Datos epidemiológicos de pacientes artrósicos de los que utilizamos su líquido sinovial (LSV)

Para los pacientes sometidos a cirugía artroscópica las muestras se han tomado según sigue:

- Líquido sinovial: punción con aguja intramuscular y jeringa a través de portal anteroexterno.
- Grasa de Hoffa: con pinza de agarre.
- Cartílago: de la cara antero-medial del CFE sobre el ligamento mucoso con trócares para la obtención de cilindros óseos de cresta ilíaca de la marca Synthes® (Synthes GmbH. Zuchwil, Suiza).

Para los pacientes sometidos a artroplastia total de rodilla, hemos usado la vía parapatelar medial para la intervención. La toma de muestras se realizó:

- Líquido sinovial: punción con aguja intramuscular y jeringa a través del retináculo medial previo a la artrotomía.
- Grasa de Hoffa: tomada con pinza y bisturí eléctrico.
- Cartílago: tomado de la cara antero-medial del CFE sobre el ligamento mucoso con pinza gubia y tomado de manera conjunta con hueso subcondral de los cortes óseos necesarios para la implantación de la PTR tanto de tibia como de fémur.

Las muestras se introdujeron en recipientes estériles con suero fisiológico y transportadas de manera urgente y refrigerada hasta el laboratorio del IMMA.

## ESTUDIO PRELIMINAR CON CULTIVO CONDRAL

---

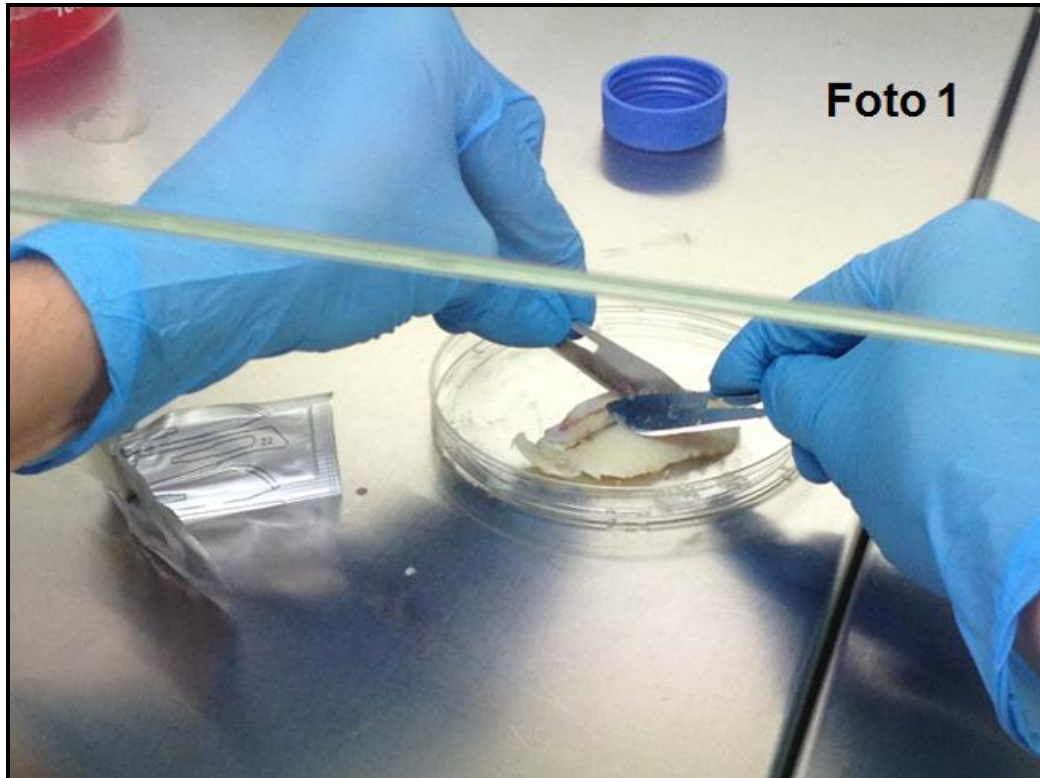
Para el estudio específico del papel del líquido sinovial frente a agentes dañinos cultivamos condrocitos a partir de cartílago de la superficie articular de rodillas artrósicas en los compartimentos articulares menos dañados con tejido condral viable.

---

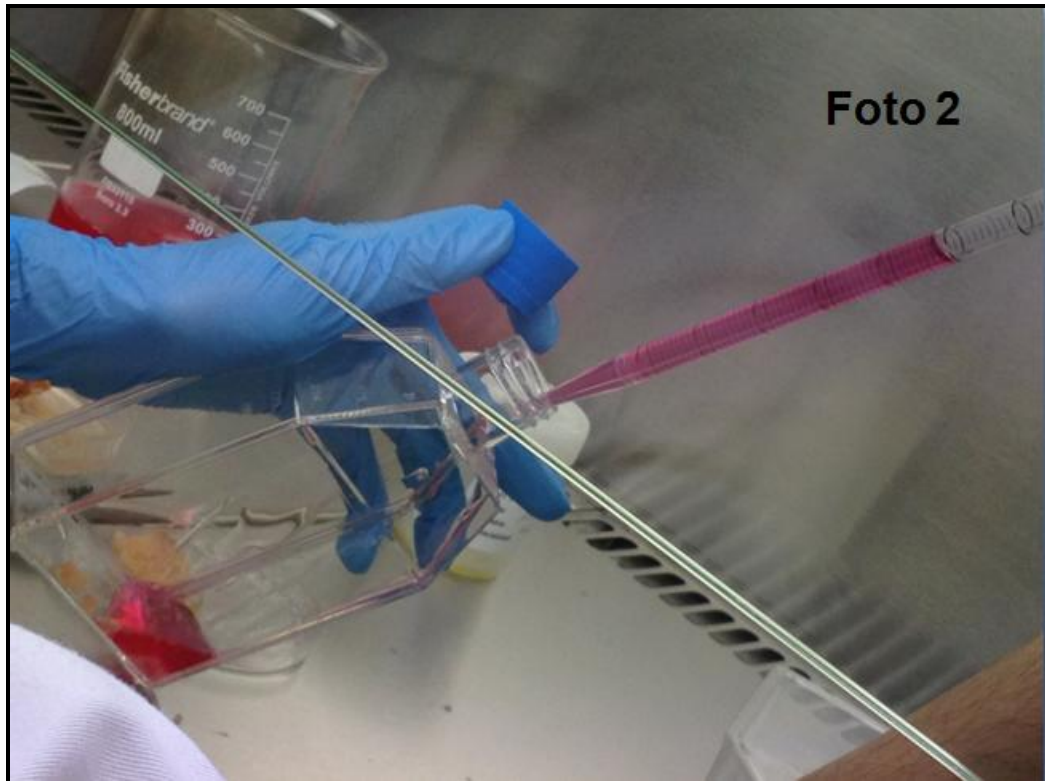
### ASLAMIENTO Y CULTIVO DE CONDROCITOS

---

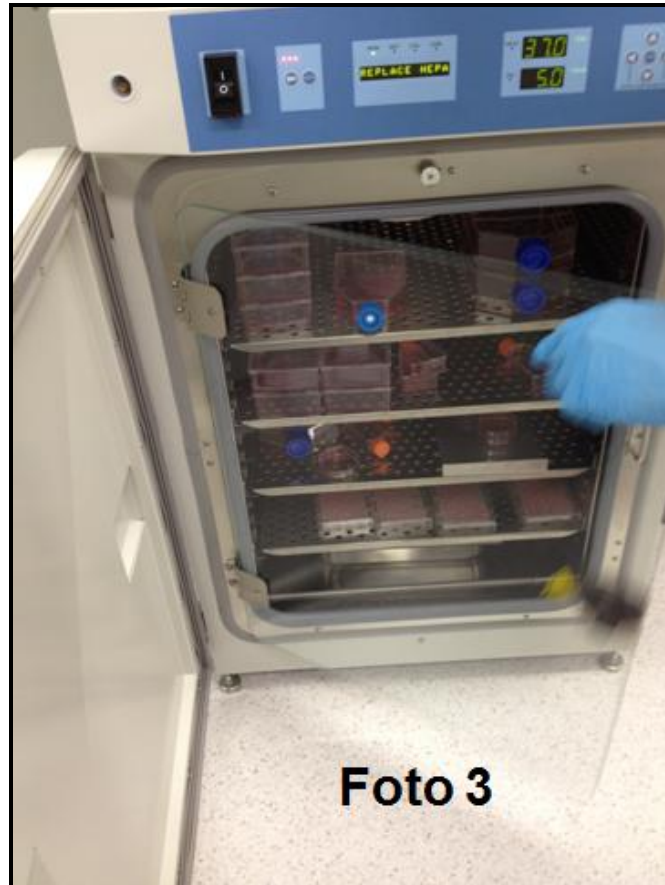
Para ello realizamos en campana la preparación de 2 Falcón (Labolan SL, España) de 50 ml y añadir 15 ml de medio de lavado (2 ml de Gentamicina ([ ] 40mg/ 2ml) (B. Braun Medical, S. A., España). Se rasca el cartílago (primero unos pequeños cortes) y trocearlo lo máximo posible, cuando terminamos, introducimos el cartílago con las manos para palpar si hay hueso (Foto 1).



Retiramos el suero en el que teníamos el tejido. Añadimos 10-15 ml de tripsina (Lonas Cat.BE17-161E) (Foto 2), dependiendo de la cantidad de cartílago que tengamos. Se tapa el Falcón con Parafilm (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) y dejar en el baño 15 min en agitación a 37 ° C (Foto 3).



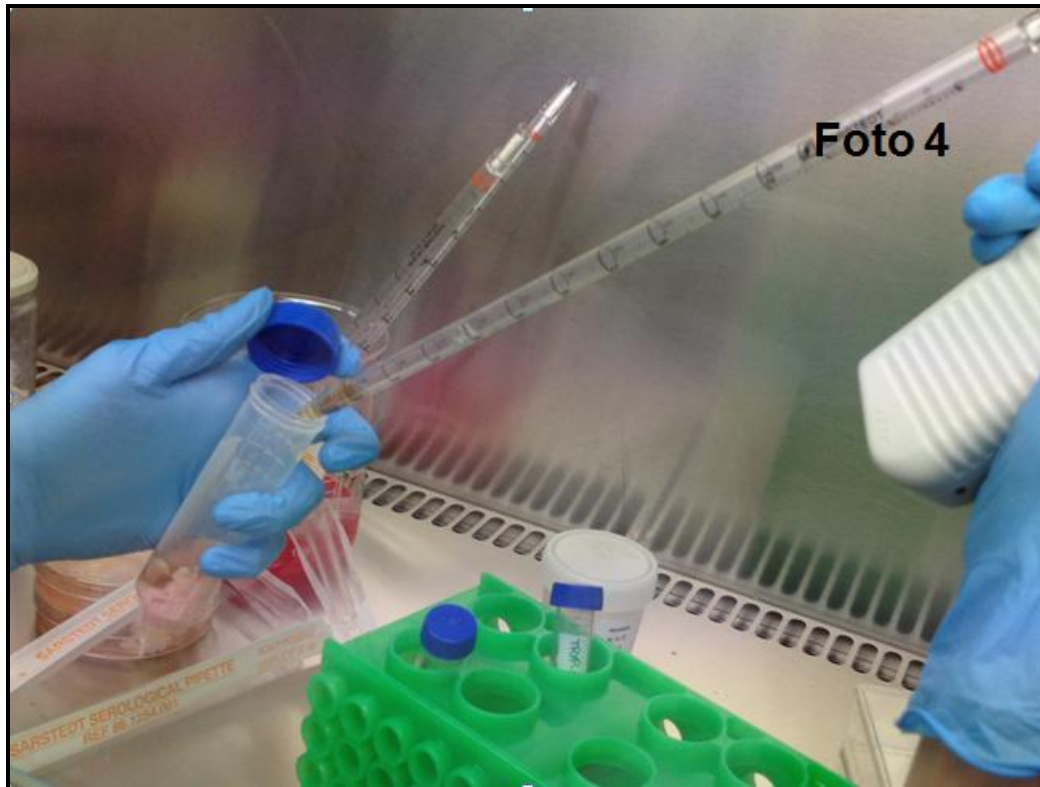
Quitamos la tripsina con ayuda de una pipeta Pasteur con cuidado para no llevarnos los trozos de cartílago (Foto 4). Añadimos 20 ml de la segunda enzima por tubo (  $[I] = 1\text{mg/ml}$ ), 20ml de medio 0.02 g Colagenasa tipo IV (Sigma: C5138-5g) ). La colagenasa se filtra 2 veces (una al prepararla y la otra cuando se añade a la muestra). Tapamos con parafilm y dejamos en el baño en agitación a 37°C durante 5 horas. Tras 5 horas recogimos todo el líquido que fue posible, sin coger los trozos de cartílago que quedan en el fondo y lo pasamos a un nuevo Falcón.



**Foto 3**

Si veíamos que el cartílago no se ha disgregado bien, podemos volver a añadir collagenasa y lo dejamos actuar un par de horas más. Centrifugamos 5 minutos a 500g a temperatura ambiente. Se decanta el líquido. Resuspendemos el pellet y sembramos en placas de petri (10-12 ml/placa) a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>.

Medio de cultivo: DMEM (Lonas BE12-614F), 10% FBS (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO), 1% P/E (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO), 1% Glutamina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). Cada 2 días cambiamos el medio y realizamos un máximo de 2 pases de condrocitos.



Fotos 1-4. Procesado de tejido condral (ver descripción en texto)

Una vez cultivados los condrocitos procedemos a hacerlos interactuar con líquido sinovial de un único paciente del grupo artrósico de la siguiente forma. Se siembran los condrocitos con su medio en una placa P24 (BRAND GMBH and CO. Wertheim. Alemania) una confluencia de 2500-3000 células por pocillo (3000 cels X 25 pocillos = 75000 cl.). A continuación retiramos el medio y añadimos:

- Pocillo 1- 6 : Medio (500ul)
- Pocillo 7-12 : 90%Medio + 10% LSV02 (2,7 ml medio + 300 microlitros LSV02)
- Pocillo 13-18: 90% Medio + 10% LSV03 (2,7 ml medio +300 microlitros LSV03)

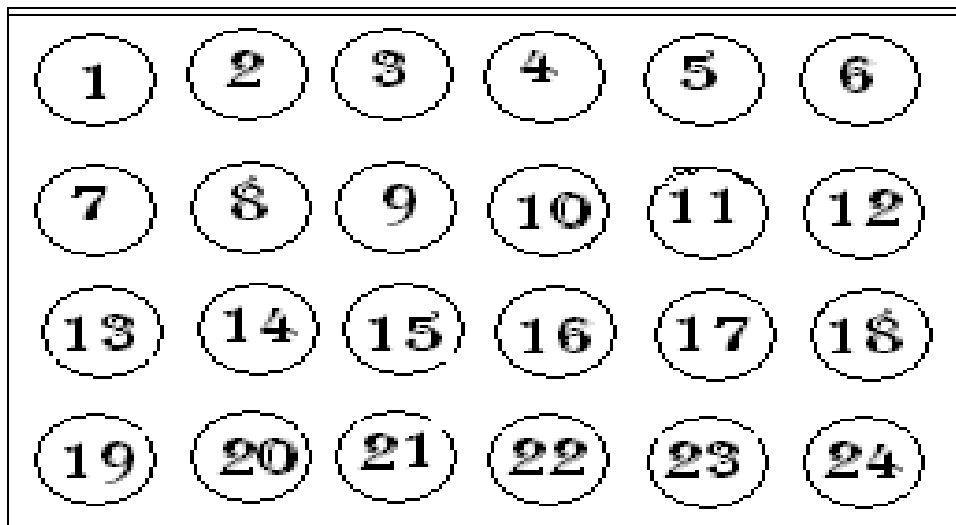


Fig 3. Modelo de placa p 24

Se deja actuar durante 24h. Al día siguiente se añade al medio:

- Pocillos 4-5-6: 5 microlitros Etopósido 5mM
- Pocillos 10-11-12: 5 microlitros Etopósido 5 mM
- Pocillos 16-17-18: 5 microlitros Etopósido 5mM (La concentración final del Etopósido es de 50 microMolar).

Se deja actuar el etopósido durante 6 horas, vigilando cada 2 horas que no haya mucha muerte celular, si la hay, paramos y contamos las vivas y las muertas de cada pocillo.



---

## ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MTS

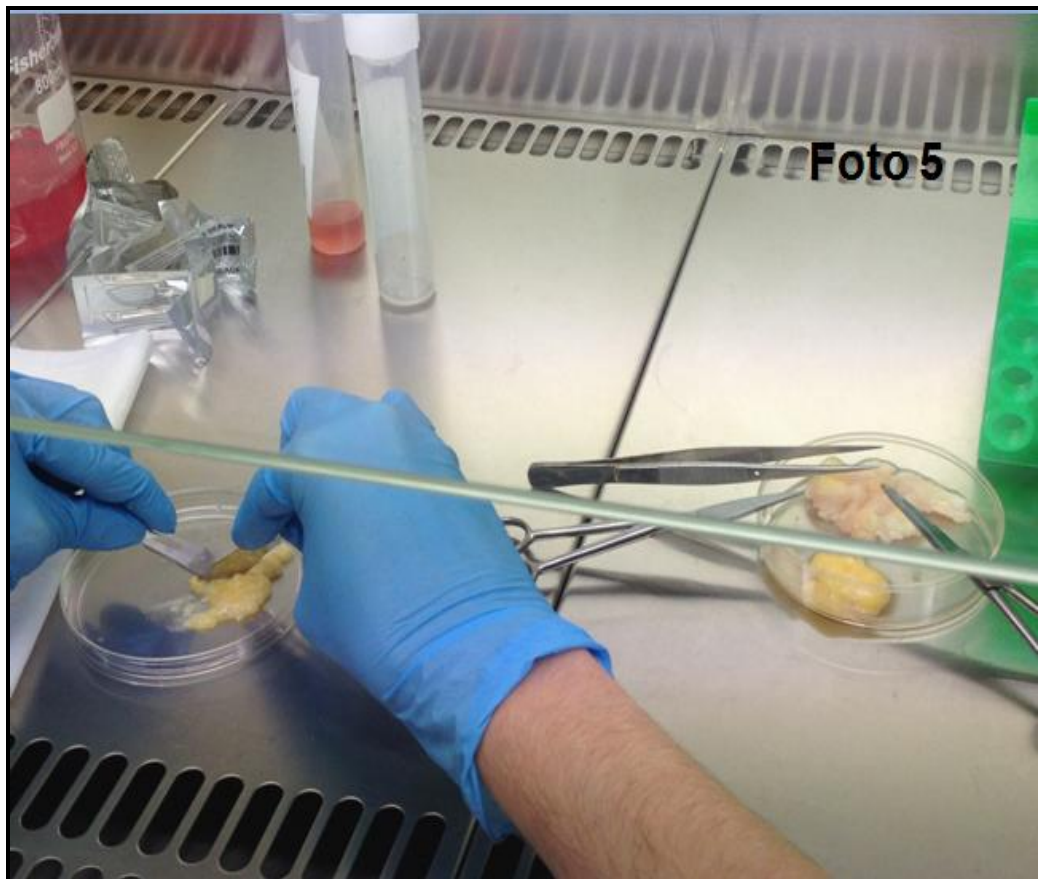
---

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron mediante el método colorimétrico, siguiendo el protocolo descrito por Mosmann et al. (113), modificado posteriormente por Cory (114), siguiendo el kit de CellTiter 96 (Promega). Es un método colorimétrico para determinar el número de células vivas en proliferación y está compuesto de una solución de una sal de tetrazolio ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 5-(3-carboxymethoxyphenyl) - 2- (4-sulphophenyl) - 2H - tetrazolium]). La conversión del MTS en una forma soluble de formazan se produce por enzimas dehidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas. La cantidad de formazan producido se puede medir a una longitud de onda de 490 nm, siendo la absorbancia proporcional al número de células vivas en cultivo. Para ello se sembrarán 10.000 células por pocillo que se incubarán, durante 24 h. Se lava con PBS, tres veces, durante 5 minutos, en agitación y se leyó la placa en el espectrofotómetro a 490 nm.

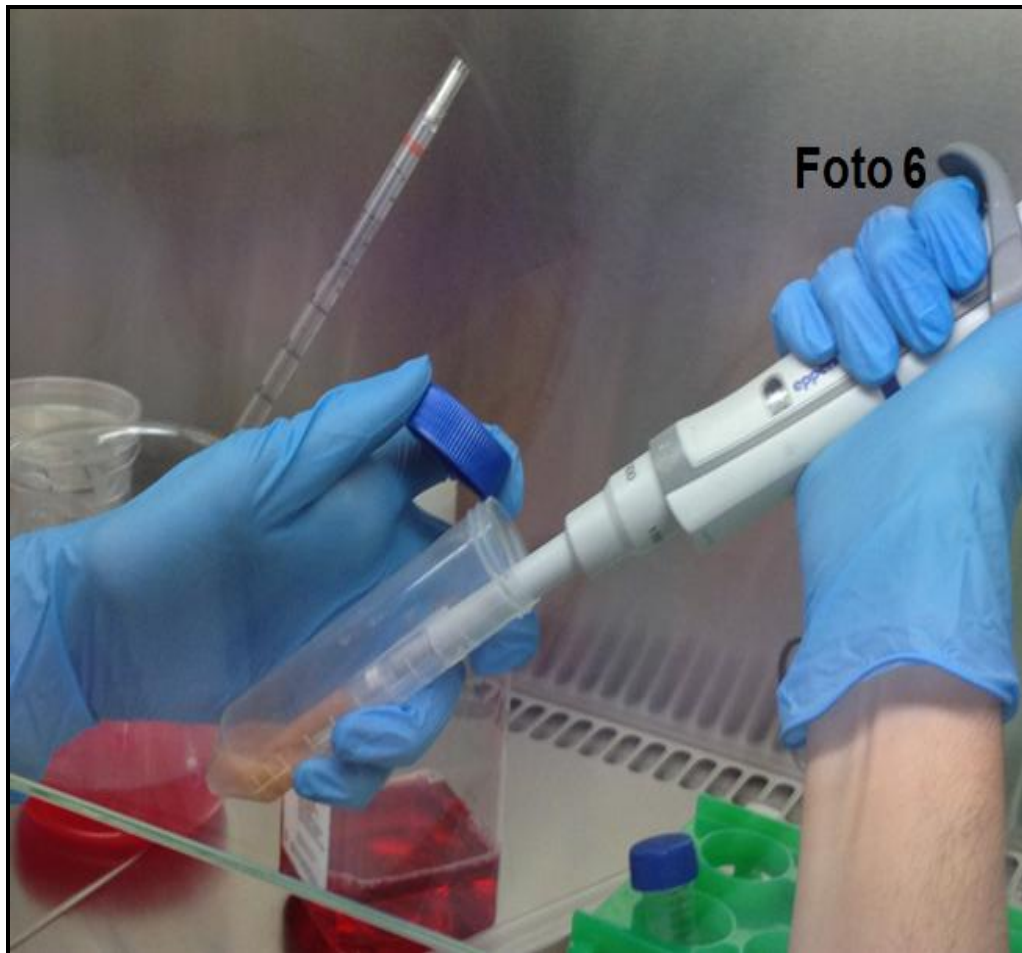
## SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO. AISLAMIENTO, CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE GRASA DE HOFFA

---

Las muestras de grasa de Hoffa son troceadas inicialmente mediante medios mecánicos (Foto 5), para retirar la membrana sinovial que la rodea y para facilitar la digestión enzimática al aumentar la superficie de contacto.

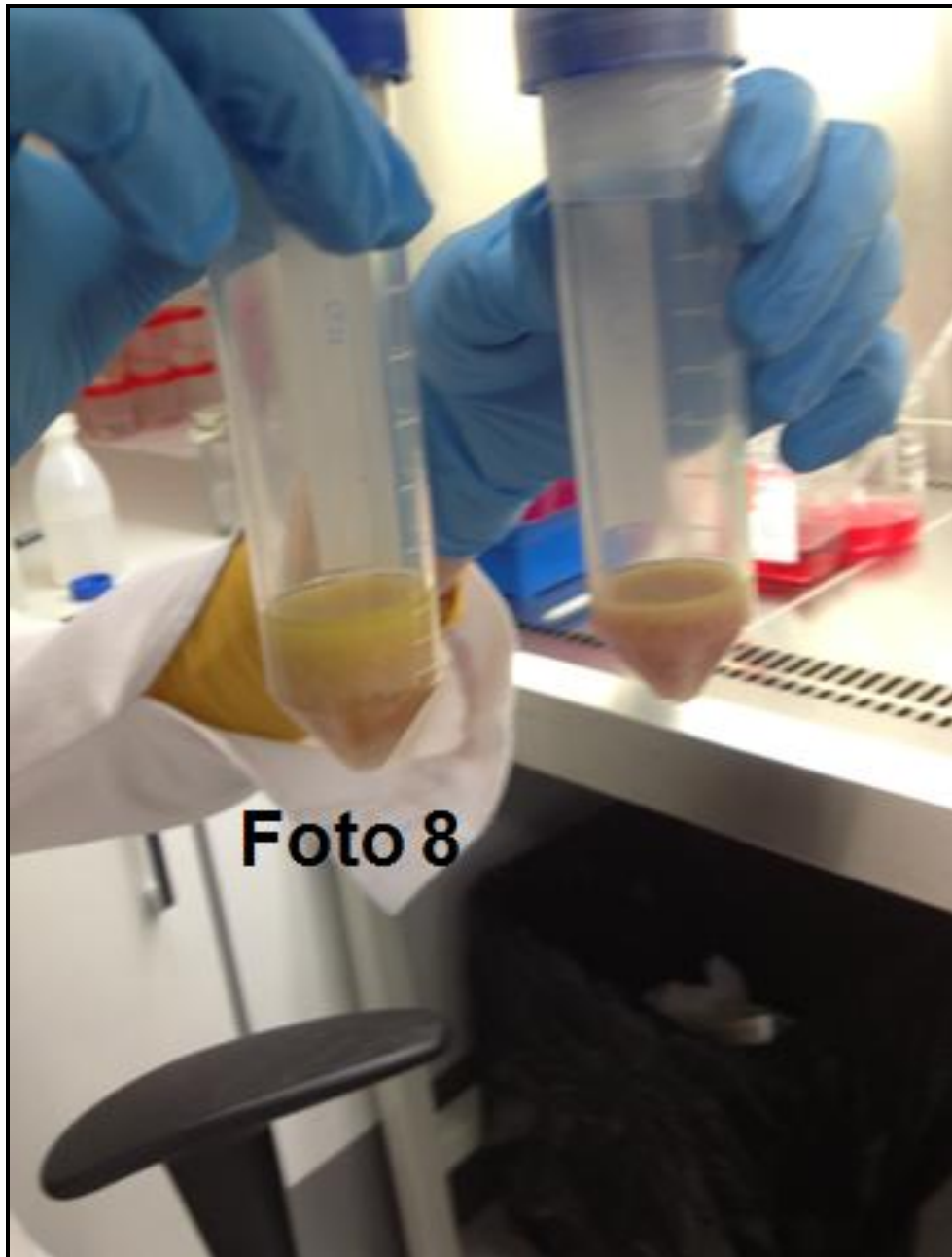


Posteriormente se someterá a un lavado con tampón fosfato tras el cual se realizará la digestión enzimática con collagenasa I (INVITROGEN, Life Technologies, NY) al 0.075 % a 37 ° C durante 30 minutos (Fotos 6 y 7).



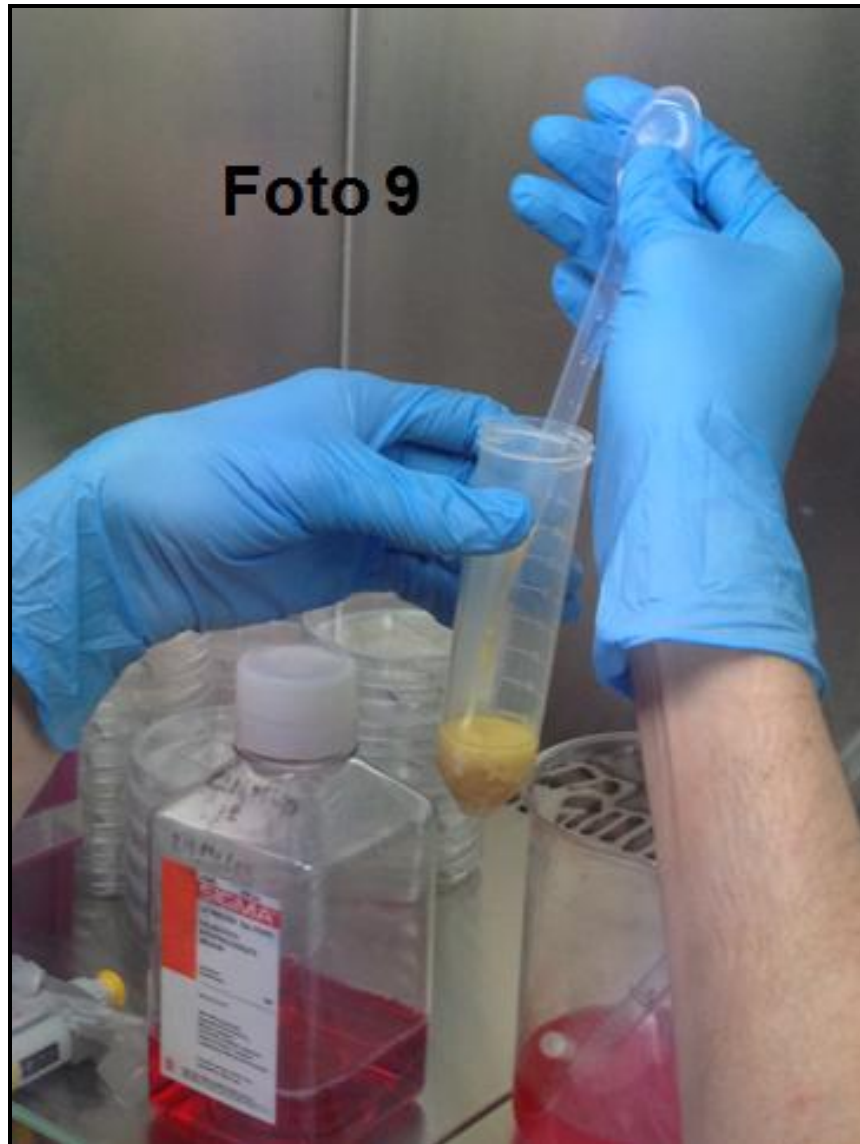


A continuación se inactivará la colagenasa con un volumen de suero fetal bovino. Se centrifuga a 1200 rpm durante 10 minutos para obtener la fracción celular. (Foto 8 y 9).



Para lisar las células sanguíneas de la fracción celular se tratará con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a 160 Mm durante 10 minutos tras los cuales se lavará la muestra, se resuspenderá en medio de cultivo, se filtrará utilizando una malla de nylon de 40 micras y se procede al conteo con cámara de Neubauer. Para favorecer la diferenciación condrogénica las células se cultivarán en un medio inductor de la condrogénesis (DMEM/F12 suplementado con FBS al 10%, 100 U/mL

penicilina G, 100 µg/mL estreptomicina, ITS+ al 1% (Sigma), 10 ng/mL TGF-β1 (Invitrogen, USA), 0.1 µM dexametasona (Sigma), y 50 µg/mL ascorbate 2-phosphate). El fenotipo cartilaginoso de las células se comprobará por tinción con Alcian blue o Safranina O.



Fotos 5-9. Procesado de grasa de Hoffa (ver descripción en texto)



---

## CULTIVO DE CÉLULAS MESENQUIMALES

---

Las células fueron sembradas en un sustrato plástico (Corning, NY) durante 24 horas en DMAX (INVITROGEN, Life Technologies, NY) con 10% FBS (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO), penicilina (100 IU/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). Las células no adheridas se retiraron y medio nuevo fue añadido para el cultivo inicial de la fracción celular adherida durante 7 días cambiando el medio de cultivo cada 3 días. Adicionalmente, algunas muestras celulares de este cultivo inicial fueron congeladas con DMSO en nitrógeno líquido.

Se utilizaron medios específicos de diferenciación celular hacia diferenciación condrogénica. Las células mesenquimales se sembraron en sustrato plástico (Corning, NY) durante 24 horas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y cultivado durante 2 días. Posteriormente, se cambió el medio de cultivo por Medios de Diferenciación (1% ITS, 0.9 nM Piruvato sódico, 50 microgramo/ml ácido ascórbico,  $10^{-7}$  M Dexametasona, 40 microgramo/ml L-Prolina, 10 microgramo/ml TGFb) con 0.1% gentamicina, penicilina (100 IU/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) durante 15 y 28 días, en algunos experimentos se añadió un líquido articular (1:10) durante 24 horas. Tras esta etapa de diferenciación, procesamos el RNA de los momentos 0, 15 días y 28 días con medios de diferenciación y del día 29 tras la adición de líquido sinovial de un único paciente del grupo artrósico al medio de diferenciación.

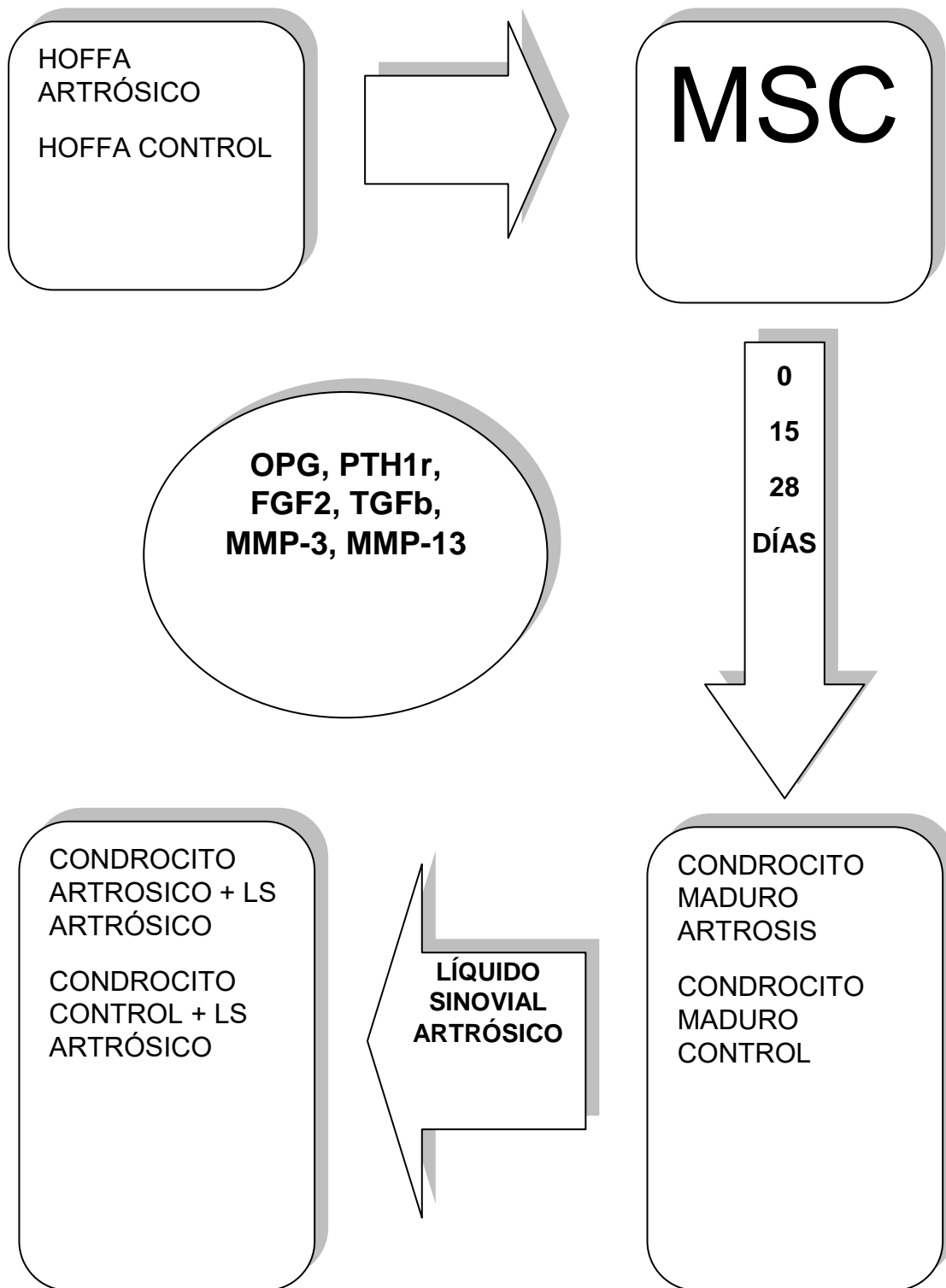


Fig.4 Diseño de la segunda fase del estudio



---

## OBTENCIÓN DE RNA Y PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

---

La expresión génica fue analizada con RT-qPCR. Se obtuvieron muestras de RNA de los días 0, 15 y 28 con medios de diferenciación y del día 28 tras la adición de 1 µl de líquido sinovial del paciente nº 02 de la tabla 5 al medio de diferenciación y se volvió a realizar mediciones de estos factores a las 24h de incubación para conocer el papel del líquido sinovial artrósico sobre cada grupo. Para ello usamos reactante Trizol (Sigma) con 10 ng de RNA por reacción y 20 nmol de cada base. Finalmente, se usó el sistema “7900HT Fast Real Time PCR” (Applied Biosystem). Se programa con la siguiente reacción: 50°C, 30 min; 94°C, 2 min, 1 ciclo; 94°C, 1 min, temperatura de enlace 1 min, 30 ciclos; y 72°C, 10 min, 1 ciclo.

Se analizó la expresión de los genes OPG, PTH1r, TGFβ, MMP-3, MMP-13 and FGF2 (concentración) (Life technologies). La cuantificación de la expresión génica se realizó con la comparación entre la expresión del gen control GAPDH y 18S y los genes de nuestro estudio. Los resultados se analizaron con SDS 2.4 System y RQ Manager Analysis.

---

## TRANSFERENCIA WESTERN

---

Extractos de proteínas de la célula (20-50 µg de proteínas), obtenidos en un tampón de lisis que contiene un cóctel de inhibidores de proteasas, fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos específicos contra las proteínas a analizar, según protocolo estándar en nuestro laboratorio (115). Las membranas se incubaron posteriormente con el

anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa. Como control de carga, se utilizó un anticuerpo anti- $\beta$ -actina. Las bandas se revelaron por (ECL, GE Healthcare).

---

## PROTEÓMICA

---

### ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL 2-DE Y EXPRESIÓN DIFERENCIAL CUANTITATIVA 2D-DIGE

---

Se utilizó la metodología recomendada por el fabricante (GE Healthcare). El isoelectroenfoque (IEF) de la primera dimensión se realizó con gradientes de pH inmovilizados (IPGs) de diversos límites de pH, utilizando una cubeta ETTAN Daltsix (GE Healthcare) con la que ya contamos en nuestro laboratorio. Cada proteína avanza en el campo eléctrico hasta alcanzar un valor de pH igual a su punto isoeléctrico (pI). Los extractos proteicos se cargan disueltos en el tampón de rehidratación. Tras la IEF se realiza el equilibrado de las tiras. La segunda dimensión, (PAGE-SDS) se lleva a cabo utilizando geles de poliacrilamida en gradiente. La lectura de los geles a las longitudes de onda específicos de Cy2, Cy3 y Cy5, se llevó a cabo en un scanner de fluorescencia Syngene. Las imágenes obtenidas de los geles realizados se analizarán conjuntamente mediante los distintos módulos del programa Dyversity, que permite la detección de las proteínas, su correlación entre los distintos geles, así como la cuantificación de las diferencias y el análisis estadístico.

## IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF/TOF

---

Las manchas correspondientes a las proteínas de interés se sometieron a digestiones en el gel y los péptidos resultantes se extraerán con acetonitrilo / TFA 0.1% y se analizarán posteriormente por MALDI-TOF-TOF (4800 Protein Analyzer, Applied Biosystems), dotados del software de análisis e interpretación adecuados. Los equipos TOF-TOF permiten tanto la realización de MS (huella peptídica) como MS/MS (secuencia total o parcial de péptidos) de forma automatizada y sus datos son analizados mediante el sistema GPS (Applied Biosystems) que realiza la interpretación de los espectros MS y los de fragmentación (MS/MS), además de búsquedas en las bases de datos, de forma automatizada, lo que acelera y facilita el trabajo de identificación de las proteínas.

## ESTUDIO DE LÍQUIDO SINOVIAL

---

Una vez extraído se conserva a 4° C, durante 24 horas o a -80°C si no superan las 96 horas. Se realizará una concentración del líquido extraído con tubos centricon® (Millipore). Se utilizará para detectar por ELISA y LUMINEX la presencia de factores anabólicos y catabólicos y proinflamatorios (OPG, PTHr1, FGF2, TGFb, MMP-3 y MMP-13)

Detección de secretoma en el líquido sinovial mediante Luminex.

---

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

---

---

### ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

---

Los estadísticos descriptivos utilizados fueron:

- Como medida de tendencia central: media.
- Como medida fundamental de dispersión: desviación estándar.

---

### ESTADÍSTICA INFERENCIAL

---

En nuestro estudio utilizamos como variable independiente en la primera fase del estudio la composición del medio de cultivo. Como variable dependiente el porcentaje de células vivas.

En la segunda fase del estudio utilizamos como variable independiente el tiempo de medición y la adición de líquido sinovial artrósico. Como variable dependiente usamos la expresión de cada factor en  $\mu\text{g/ml}$ .

Siguiendo el test de normalidad de Shapiro Wilk, los datos fueron analizados mediante el test de ANOVA de 2 vías al realizar mediciones de una misma variable en diferentes momentos. El test de contrastes no planeados (*post hoc*) utilizado fue el de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey, tras confirmar que las varianzas eran iguales con la prueba de Levene.

Se fijó como error tipo I 0,05(\*), 0,01(\*\*) y 0,001(\*\*\*)

El sistema informático utilizado fue Graph pad (Prism, La Jolla, CA)



# RESULTADOS

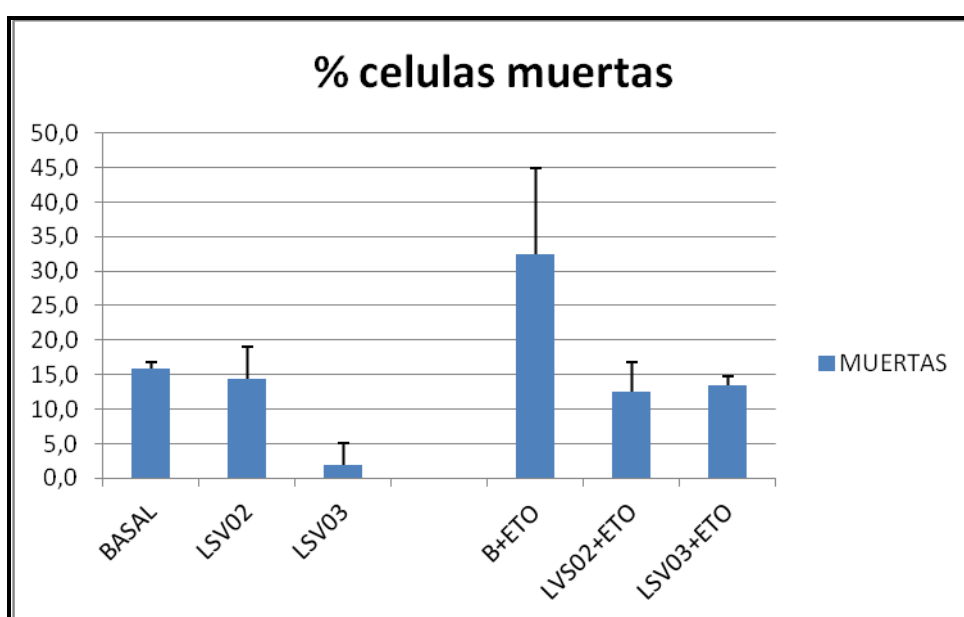
---



## ESTUDIO PRELIMINAR

El estudio preliminar que llevamos a cabo, fue para analizar el papel que desempeña el líquido sinovial con el cartílago al someter éste a distintos agentes dañinos.

Así objetivamos una disminución en el número total de condrocitos muertos al exponer el cultivo condral a etopósido (ETO), si en el medio de cultivo añadíamos líquido sinovial de pacientes artrósicos, frente a los cultivos condrocitarios en lo que sólo había medio de cultivo. Sin embargo no existe significación estadística ( $p < 0,05$ ) con todos los grupos de cultivos, sino que parece líquido sinovial dependiente. (Ver tabla 6)



	BASAL	LSV02	LSV03	B+ETO	LVS02+ETO	LSV03+ETO
MUERTAS	16,0	14,4	1,8	32,5	12,6	13,4
Desv.	0,91924	4,603	3,175	12,48	4,315	1,273

Tabla 8. Gráfica y distribución de los distintos cultivos condrales sometidos a diversos agentes



Dicha significación estadística sólo la encontramos en el grupo de condrocitos a los que se les suministra líquido sinovial del paciente 03 de la tabla 5 (LSV 03). Así mismo podemos comprobar en la gráfica, que los cultivos condrales sin etopósido, podemos encontrar una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo basal y al que se le suministra éste mismo líquido sinovial. De aquí se desprende que este líquido sinovial no sólo protege en situaciones estresantes a los cultivos condrocitarios sino que también lo hace en situaciones basales.

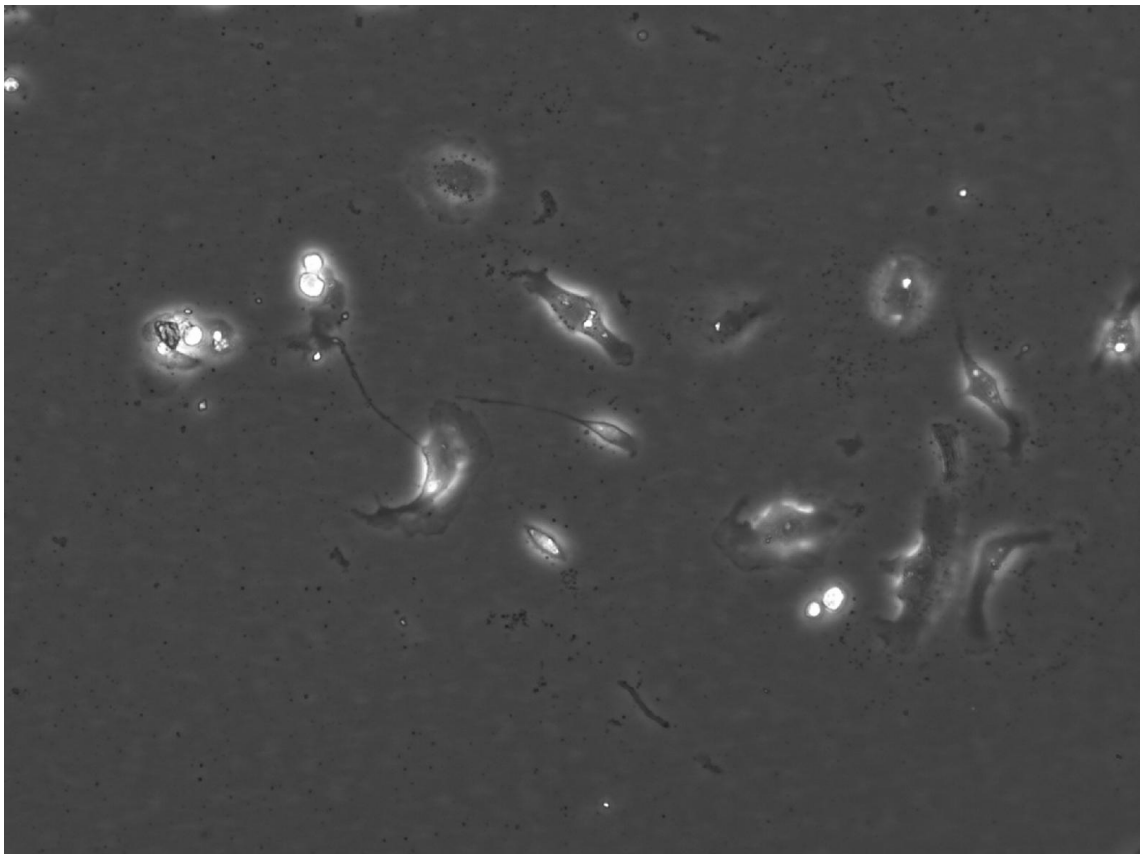


Foto 10. Foto de microscopía electrónica de un cultivo de condrocitos

## SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO

---

En una segunda fase del estudio procedimos a analizar las muestras de grasa de Hoffa de 6 pacientes del grupo control y 6 del grupo artrósico o grave.

A partir de estas muestras de grasa de Hoffa se aislaron MSC. Una vez obtenidas se diferenciaron a condrocitos durante 28 días.

En dicha fase se analizaron distintos factores anabólicos y catabólicos comunes a los integrantes normales de una rodilla, como son membrana sinovial, hueso, grasa de Hoffa, cartílago: OPG, PTH1r, FGF2, TGFb, MMP3, MMP13.

Dichas mediciones se realizaron en los días 0, 15, 28 y tras el tratamiento con líquido sinovial de un paciente artrósico (LSV02) e incubación durante 24 horas.

Las concentraciones se modificaron de manera diferente en cada molécula, tanto en la expresión absoluta como en la proporcional a lo largo de los primeros 28 días, así como tras la administración de líquido sinovial artrósico.

A continuación se expone el comportamiento individualizado de cada molécula a lo largo del tiempo, así como tras la administración de líquido sinovial.

---

## OPG

---

La determinación de OPG en el grupo control mostró una expresión parecida en los tres tiempos medidos. Al añadir líquido sinovial artrósico se objetivó un aumento importante de la concentración previa. En el grupo de pacientes artrósicos se objetivó una expresión baja sin que hubiera diferencias al añadir líquido artrósico.

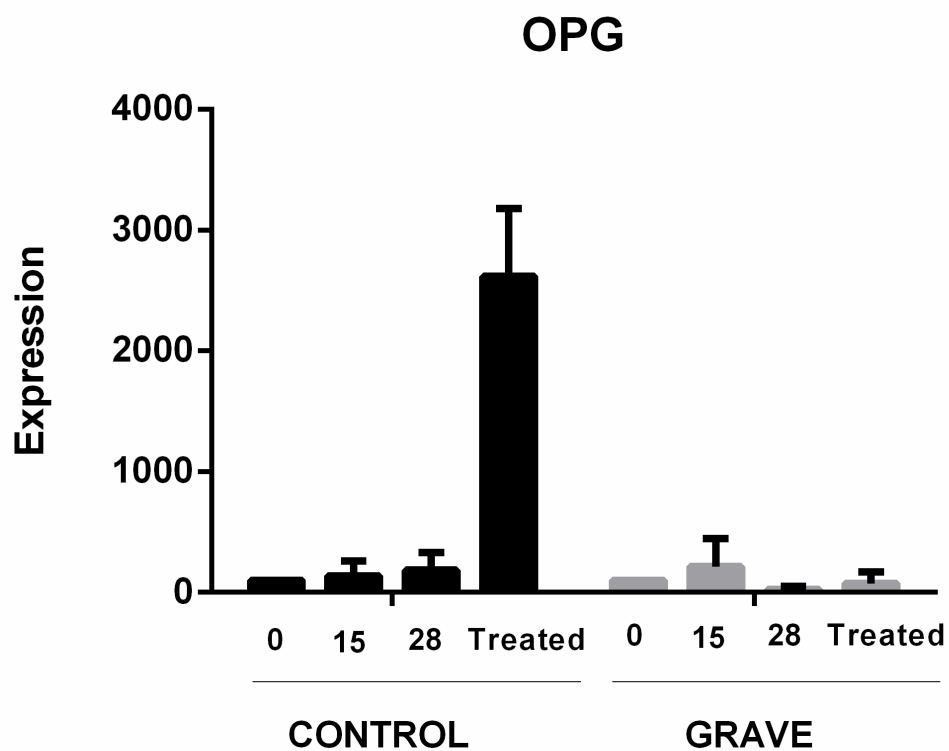


Tabla 9. Expresión de OPG en pacientes control y graves (artrósicos)

Sin embargo cuando se compararon cada uno de los momentos de la diferenciación de MSC a condrocitos, la expresión resultó estadísticamente significativa superior en el grupo de estudio frente al control en el día 15 y en el grupo control frente al grupo de estudio en el día 28.

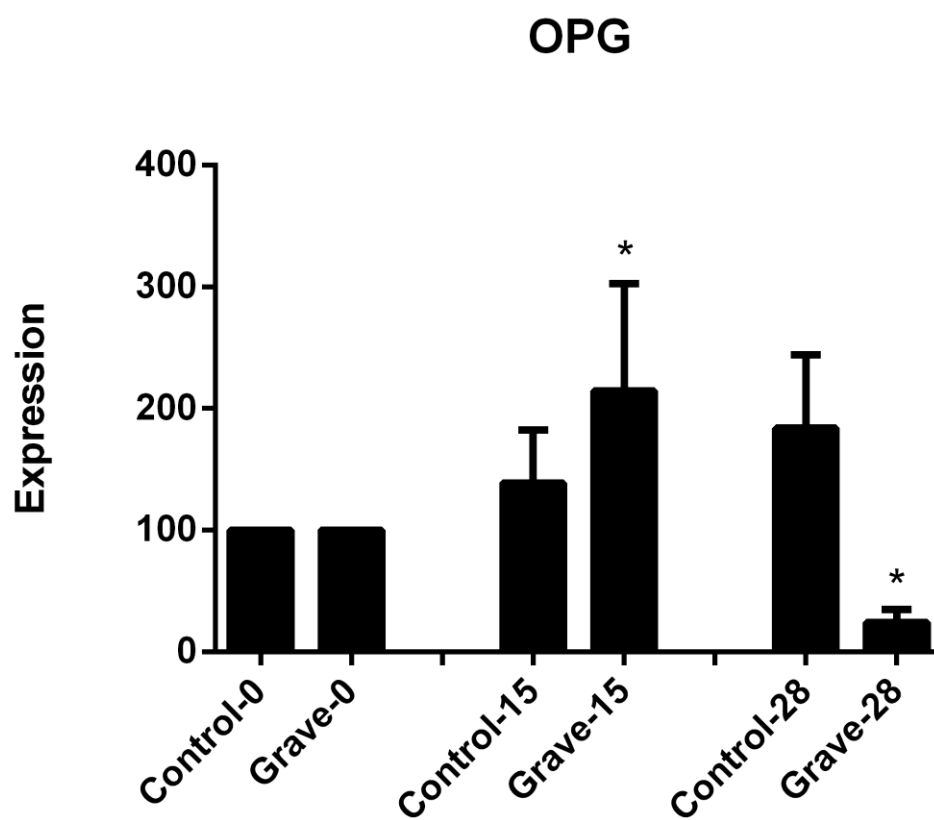


Tabla 10. Expresión comparativa de OPG en pacientes control y artrósicos durante el proceso de diferenciación a condrocito

Al añadir líquido sinovial artrósico al cultivo de condrocitos, se observó un aumento de expresión de OPG de más de un 1400%(p<0,001) en el grupo control mientras que no se modificó su expresión en el caso del grupo artrósico.

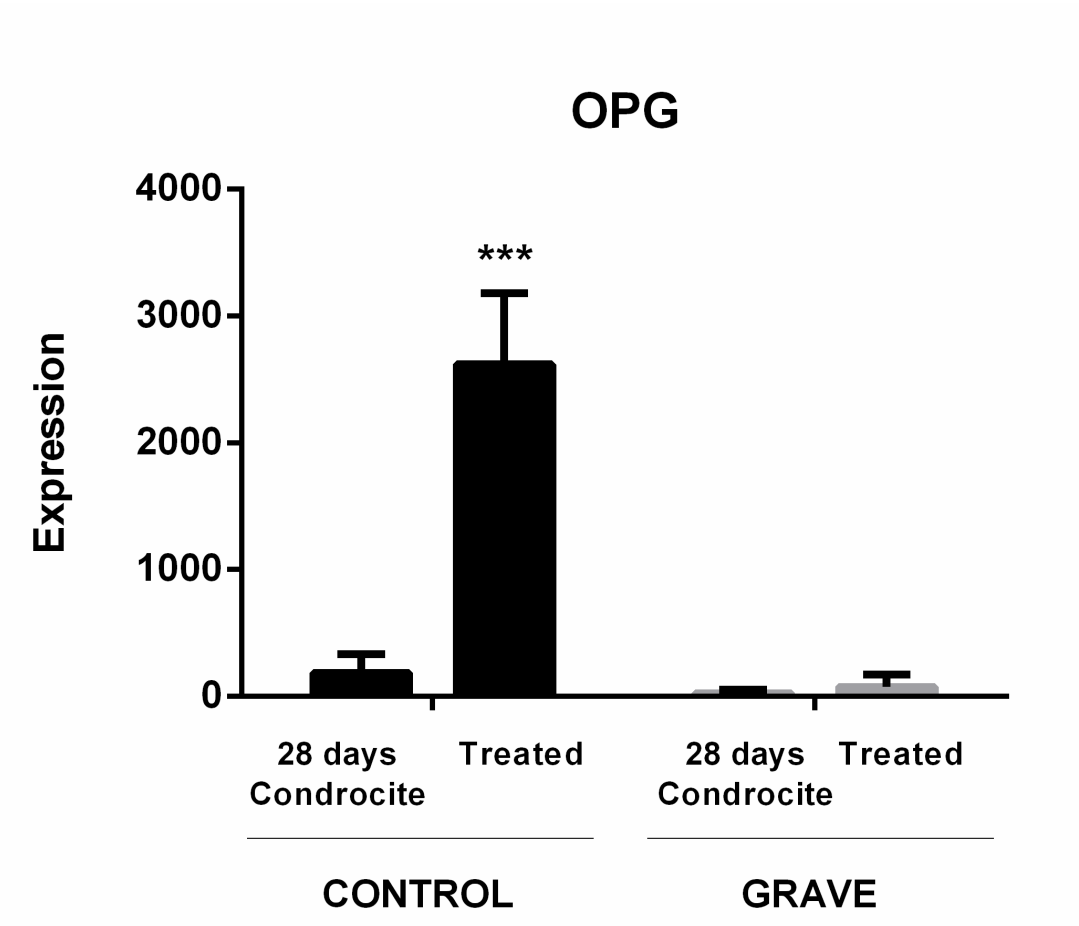


Tabla 11. Expresión comparativa de OPG en pacientes control y artrósicos al tratar los cultivos de condrocitos con líquido sinovial artrósico

---

 PTH 1R
 

---

La determinación de PTH1r en el grupo control mostró una expresión parecida en los tres tiempos medidos sin diferencias significativas aunque con tendencia a aumentar. Al añadir líquido sinovial artrósico se objetivó un aumento importante de la concentración previa. En el grupo de pacientes artrósicos se objetivó una expresión similar al grupo control, sin embargo al añadir líquido artrósico se produjo un descenso importante en su concentración.

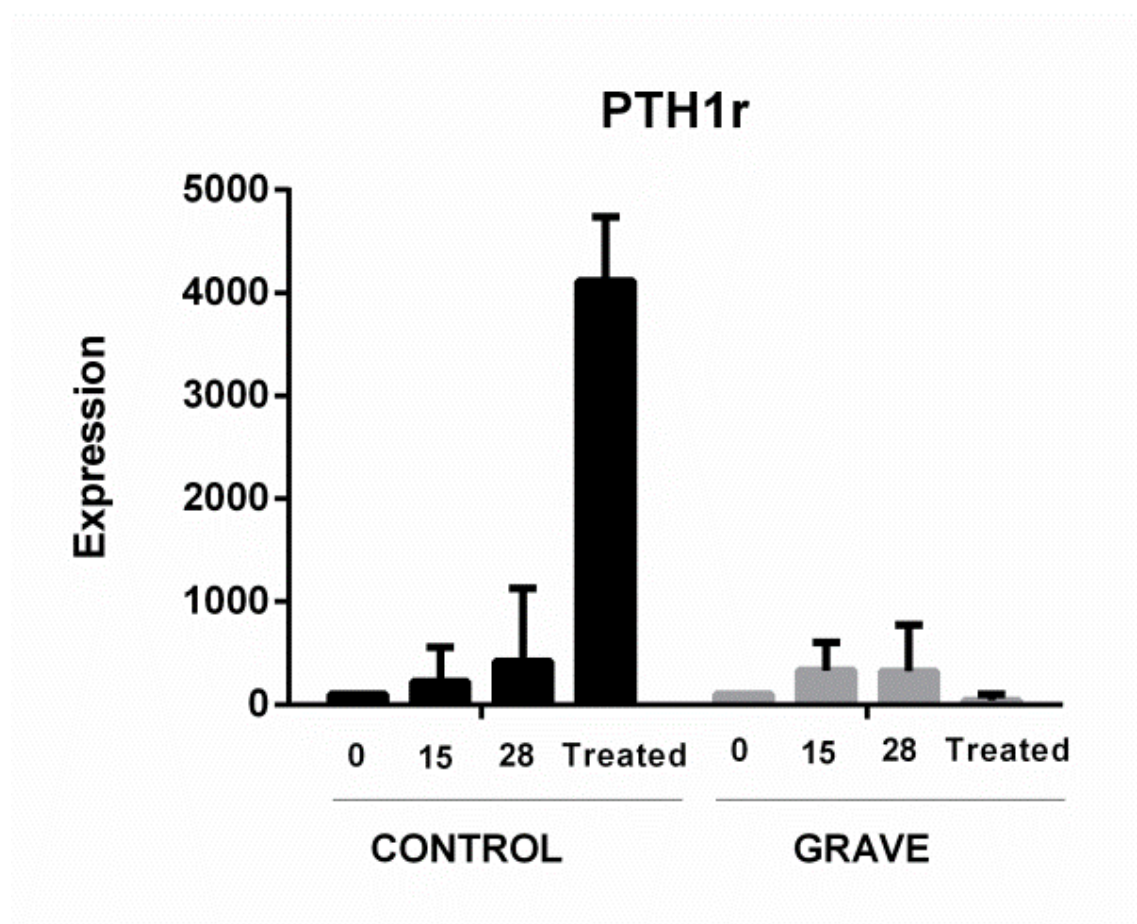


Tabla 12. Expresión de PTH1r en pacientes control y graves (artrósicos)
---

Comparando las expresiones de PTH1r, en cada momento de la diferenciación condrocitaria, observamos un aumento progresivo de la expresión tanto en el grupo control como artrósico. En el grupo control hay un mayor aumento, no significativo, el día 28 de cultivo.

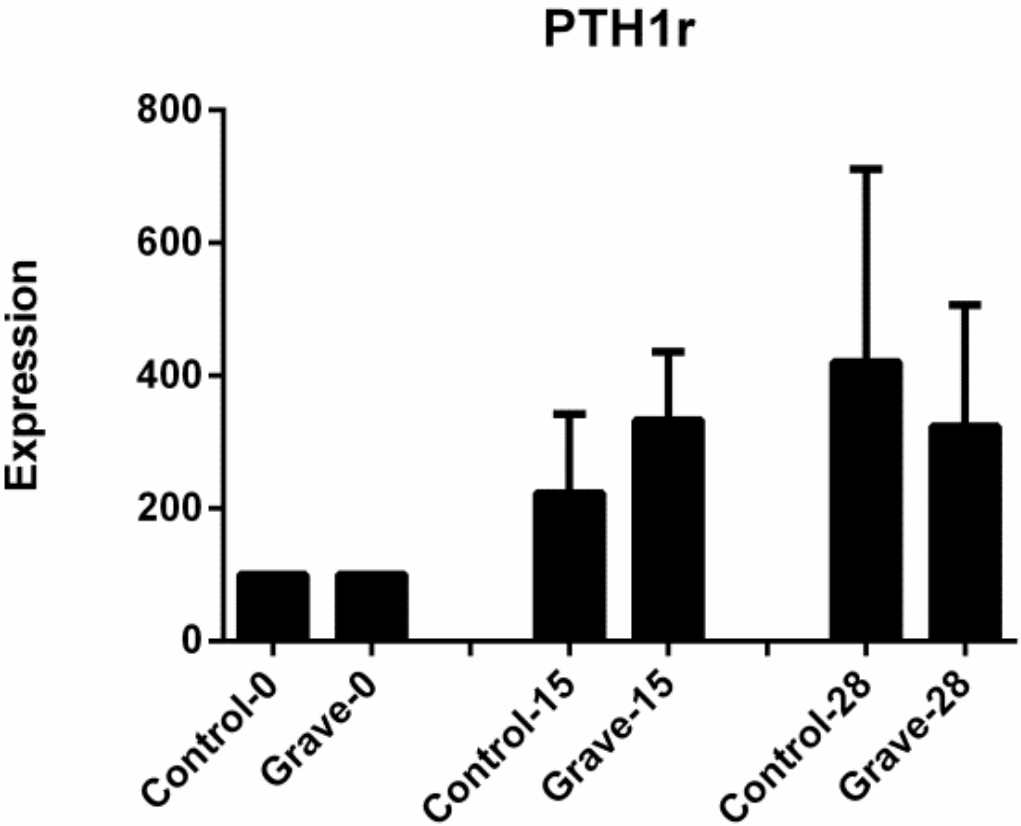


Tabla 13. Expresión comparativa de PTH1r en pacientes control y artrósicos durante el proceso de diferenciación a condrocito

Al añadir líquido sinovial artrósico hay una expresión aumentada, casi 1000% en el grupo control mientras que en el grupo artrósico observamos una disminución importante de la misma, casi 7 veces menos, comparando con el cultivo del día anterior. En ambos grupos hubo significación estadística.

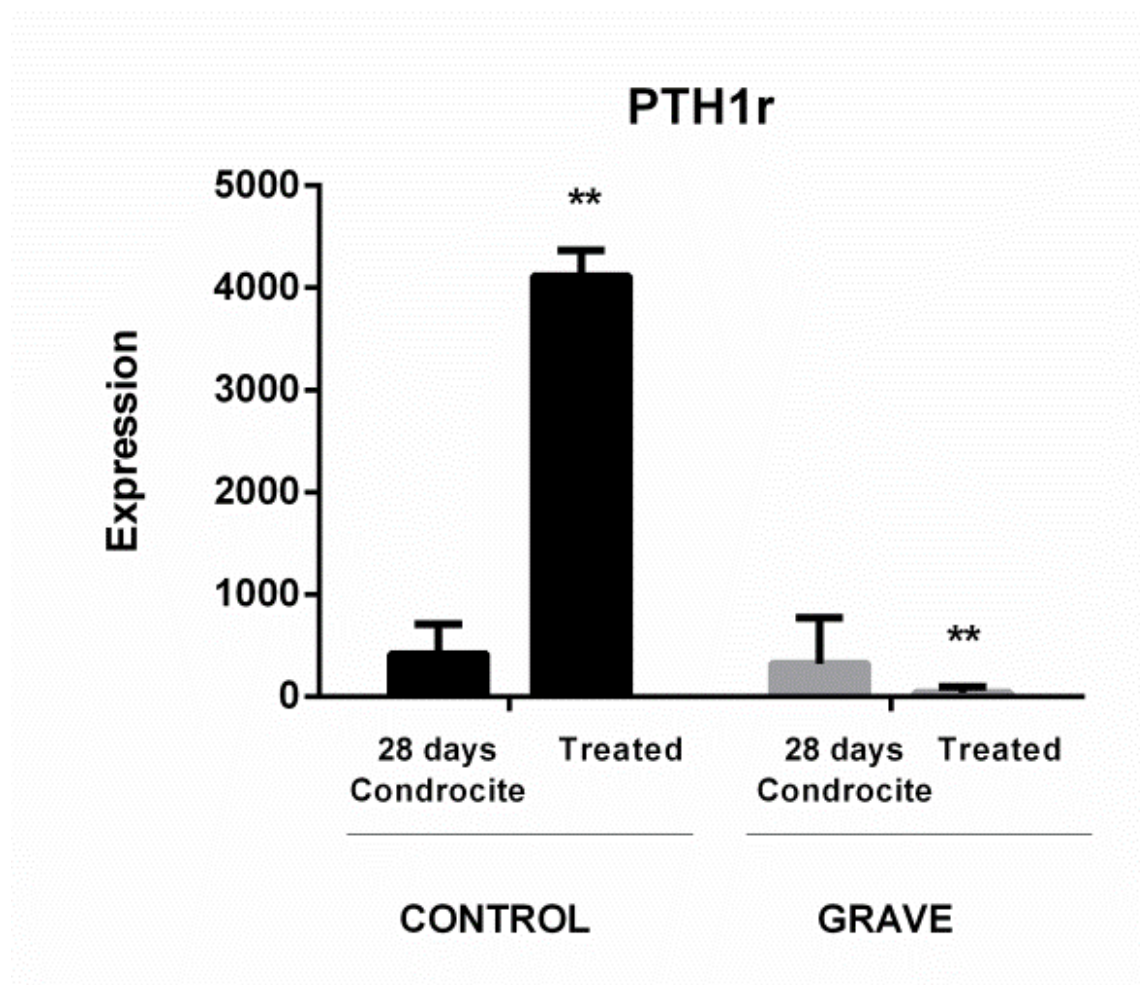


Tabla 14. Expresión comparativa de PTH1r en pacientes control y artrósicos al tratar los cultivos de condrocitos con líquido sinovial artrósico



---

## FGF2

---

La determinación de FGF2 en el grupo control mostró una expresión en aumento progresivo con el paso del tiempo. Al añadir líquido sinovial artrósico se objetivó una disminución importante de la concentración previa. En el grupo de pacientes artrósicos se objetivó una expresión baja sin que hubiera diferencias al añadir líquido artrósico.

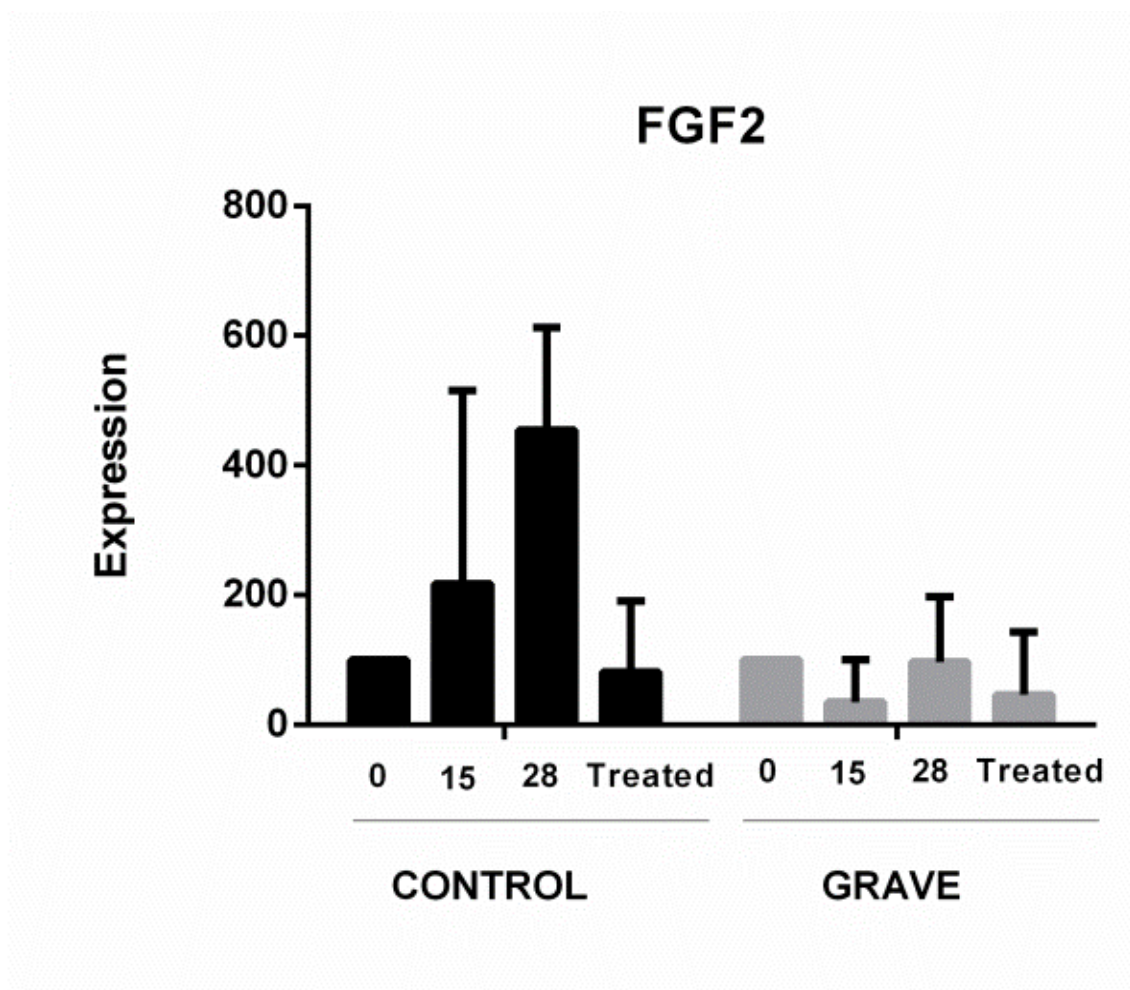


Tabla 15. Expresión de FGF2 en pacientes control y graves (artrósicos)

Sin embargo cuando se compararon cada uno de los momentos de la diferenciación de MSC a condrocitos, la expresión resultó estadísticamente significativa superior en el grupo control frente al grupo de estudio en los días 15 y 28.

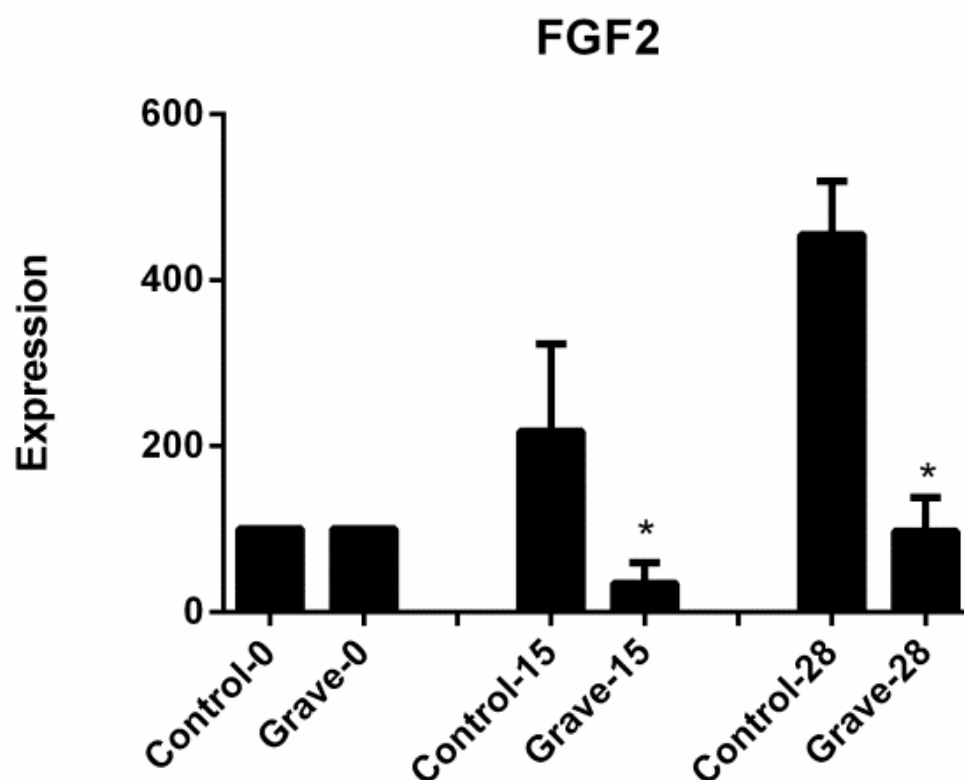


Tabla 16. Expresión comparativa de FGF2 en pacientes control y artrósicos durante el proceso de diferenciación a condrocito

Al añadir líquido sinovial artrósico hay una disminución significativa en la expresión de más de 5 veces menor que en el día previo en el grupo control mientras que en el grupo artrósico no observamos modificación con respecto al día 28.

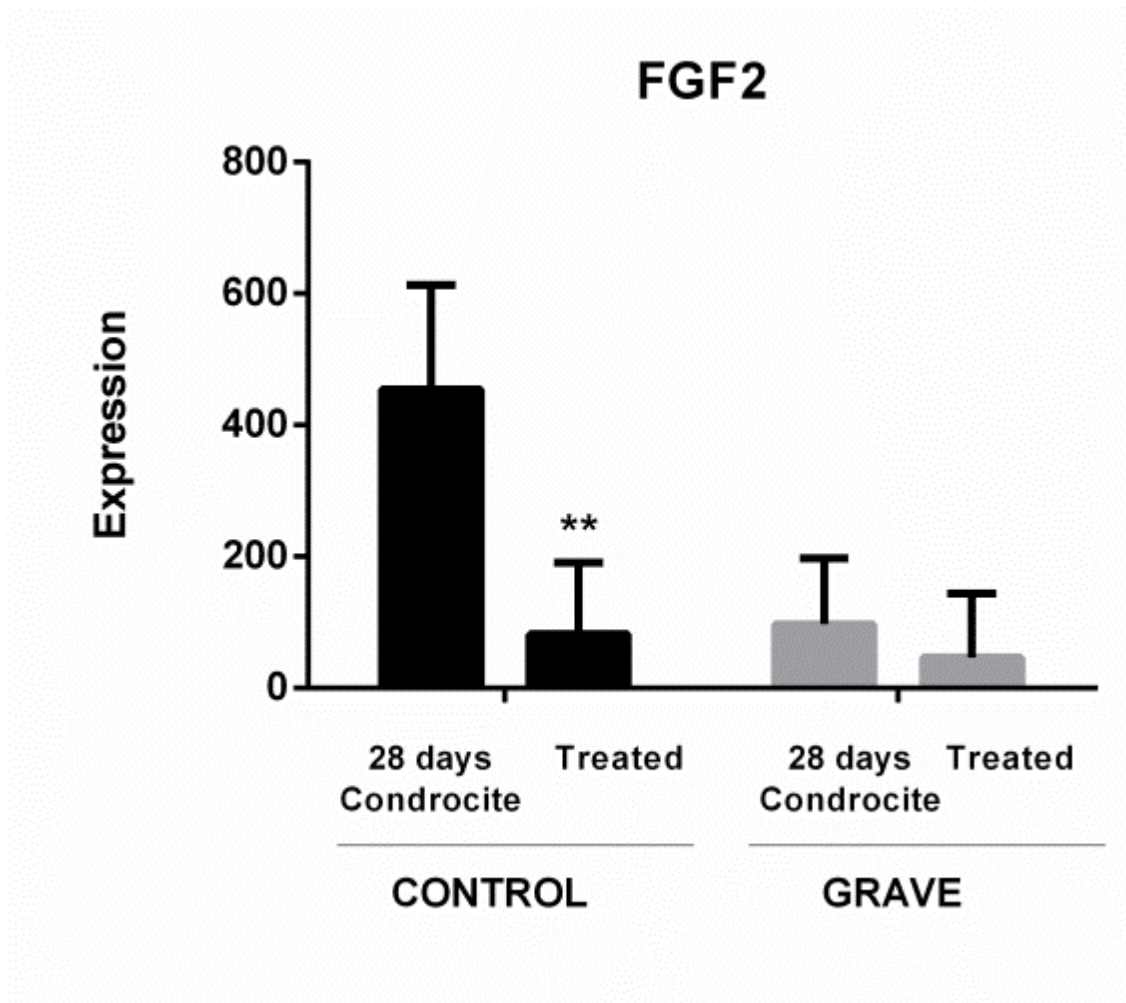


Tabla 17. Expresión comparativa de FGF2 en pacientes control y artrósicos al tratar los cultivos de condrocitos con líquido sinovial artrósico

---

 TGFB
 

---

La expresión de TGFb se mantiene elevada a lo largo del tiempo y aumenta al añadir líquido artrósico. El comportamiento de los cultivos celulares del grupo artrósico no muestra variaciones significativas a lo largo del estudio ni siquiera con la adición de líquido sinovial.

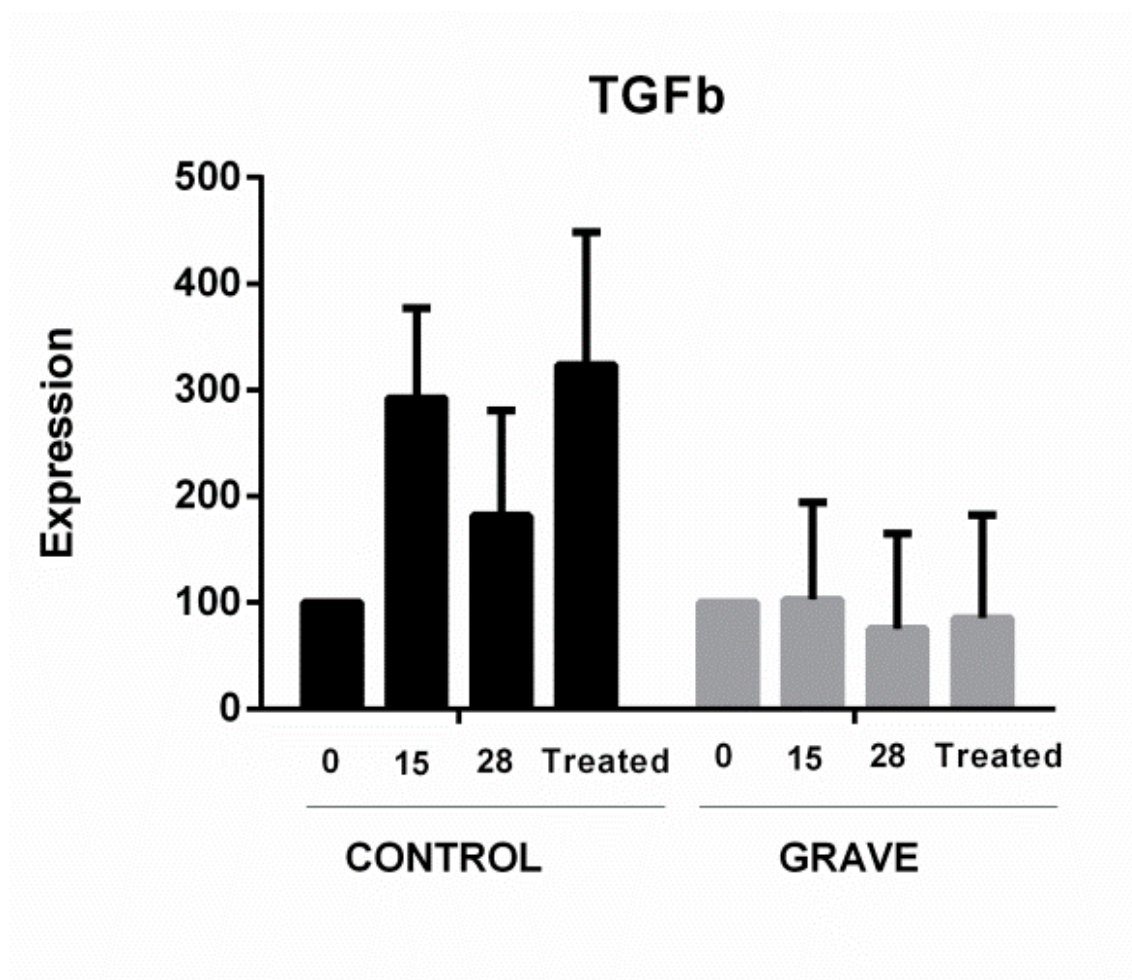


Tabla 18. Expresión de TGFb en pacientes control y graves (artrósicos)
--

Sin embargo cuando se compararon cada uno de los momentos de la diferenciación de MSC a condrocitos, la expresión resultó estadísticamente significativa superior en el grupo control frente al grupo de estudio en los días 15 y 28, siendo más llamativa en la fase de condroblasto que en la de condrocito.

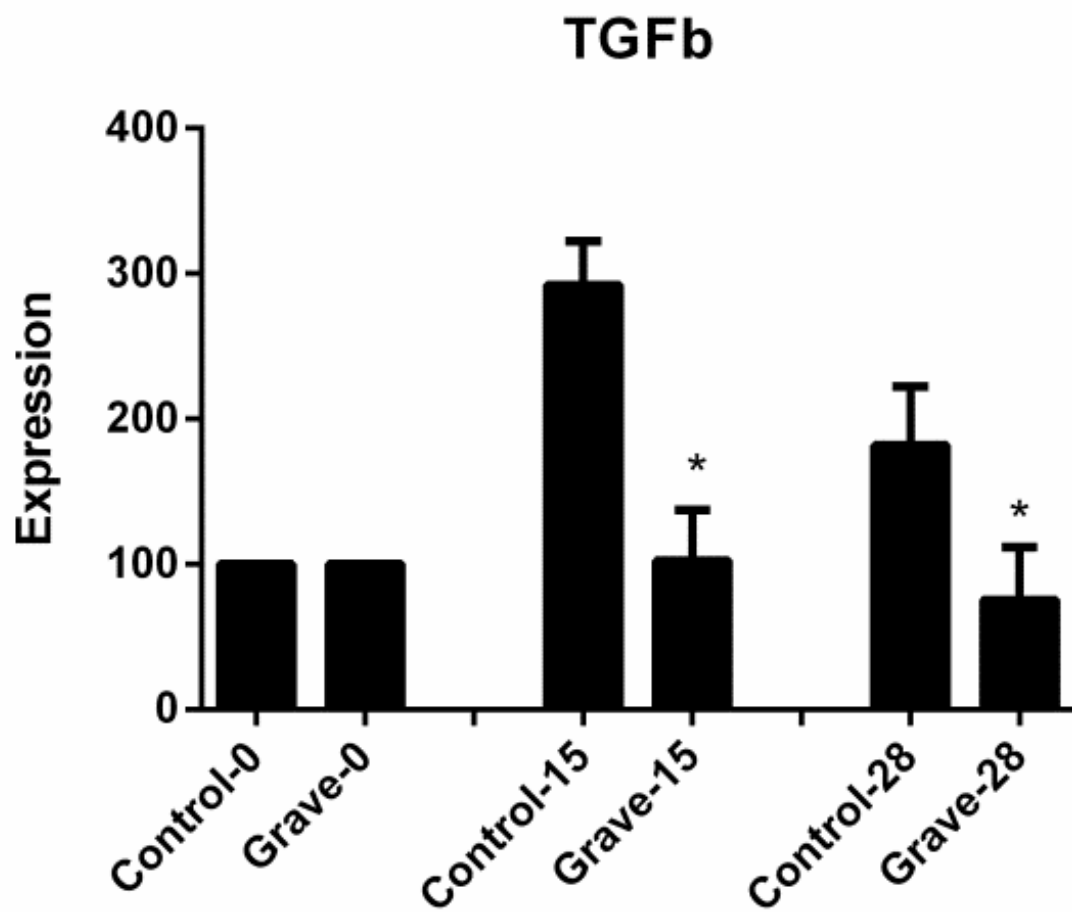


Tabla 19. Expresión comparativa de TGFb en pacientes control y artrósicos durante el proceso de diferenciación a condrocito

Al añadir líquido sinovial artrósico al cultivo de condrocitos, se observó casi el doble de expresión de TGFb ( $p<0,05$ ) en el grupo control mientras que no se modificó su expresión en el caso del grupo artrósico.

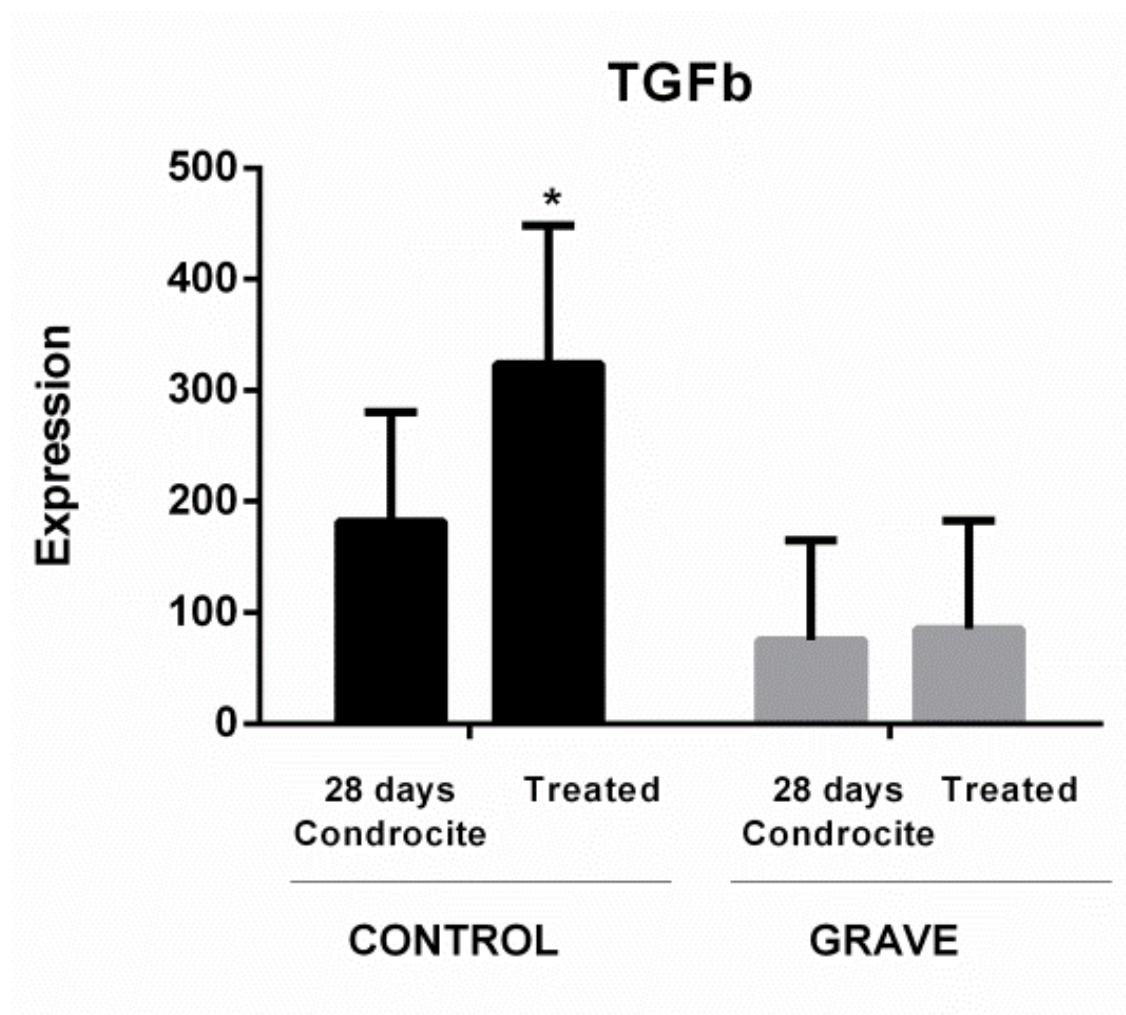


Tabla 20. Expresión comparativa de TGFb en pacientes control y artrósicos al tratar los cultivos de condrocitos con líquido sinovial artrósico

---

## MMP3

---

El análisis de la expresión de MMP3 reveló un aumento progresivo en el grupo de control hasta el día 28. En el caso del grupo de estudio, no hubo cambios durante el proceso de diferenciación. En ambos grupos, el comportamiento ante la adición de líquido sinovial fue similar, presentando una disminución en la expresión de MMP3, siendo más llamativa en el grupo control.

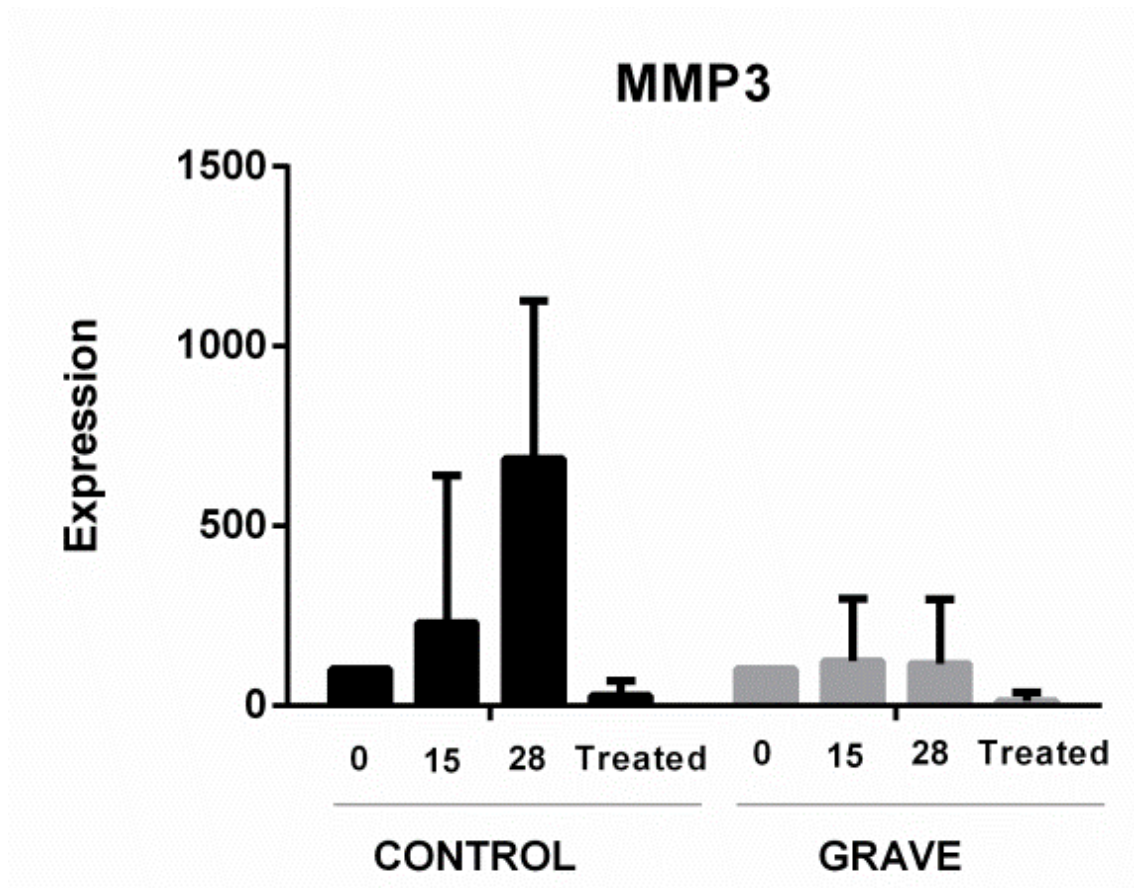


Tabla 21. Expresión de MMP3 en pacientes control y graves (artrósicos)

Sin embargo cuando se compararon cada uno de los momentos de la diferenciación de MSC a condrocitos, sólo hubo diferencia con significación estadística favorable al grupo control frente al grupo de estudio en el día 28.

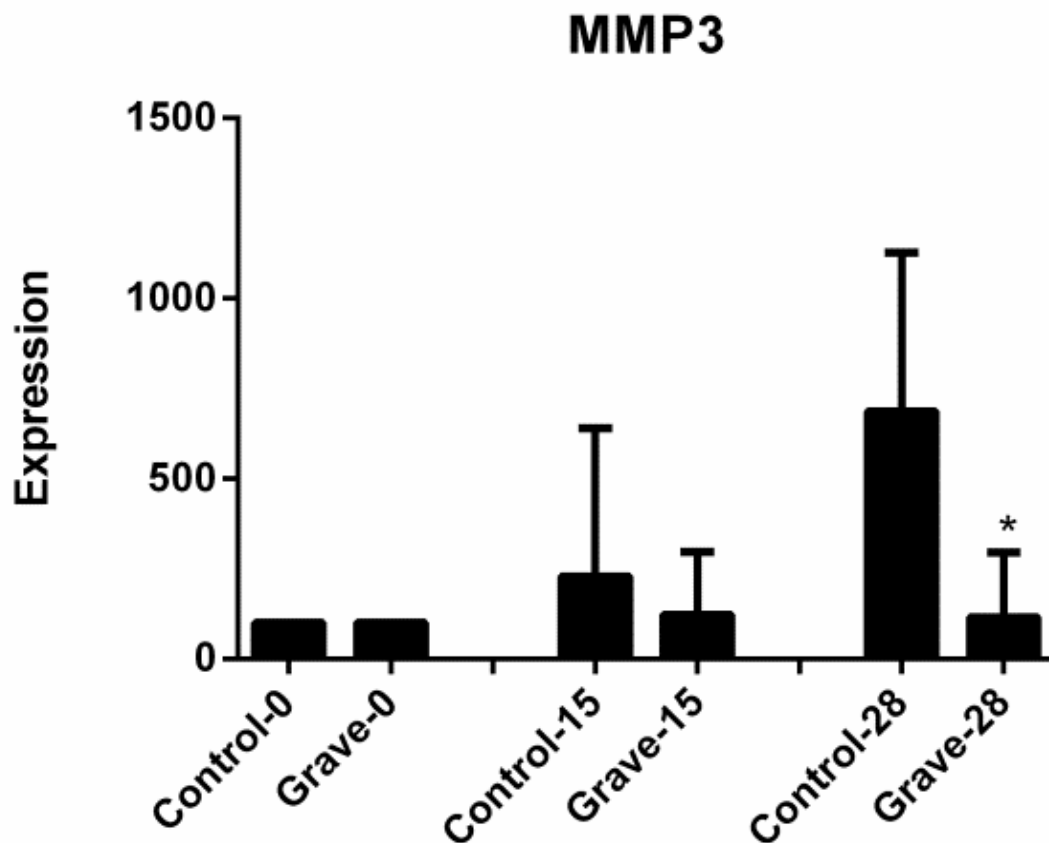


Tabla 22. Expresión comparativa de MMP3 en pacientes control y artrósicos durante el proceso de diferenciación a condrocito



Al añadir líquido sinovial artrósico hay una disminución significativa en la expresión de más de 25 veces menor que en el día previo en el grupo control mientras que en el grupo artrósico observamos también disminución con respecto al día 28 aunque sin significación estadística.

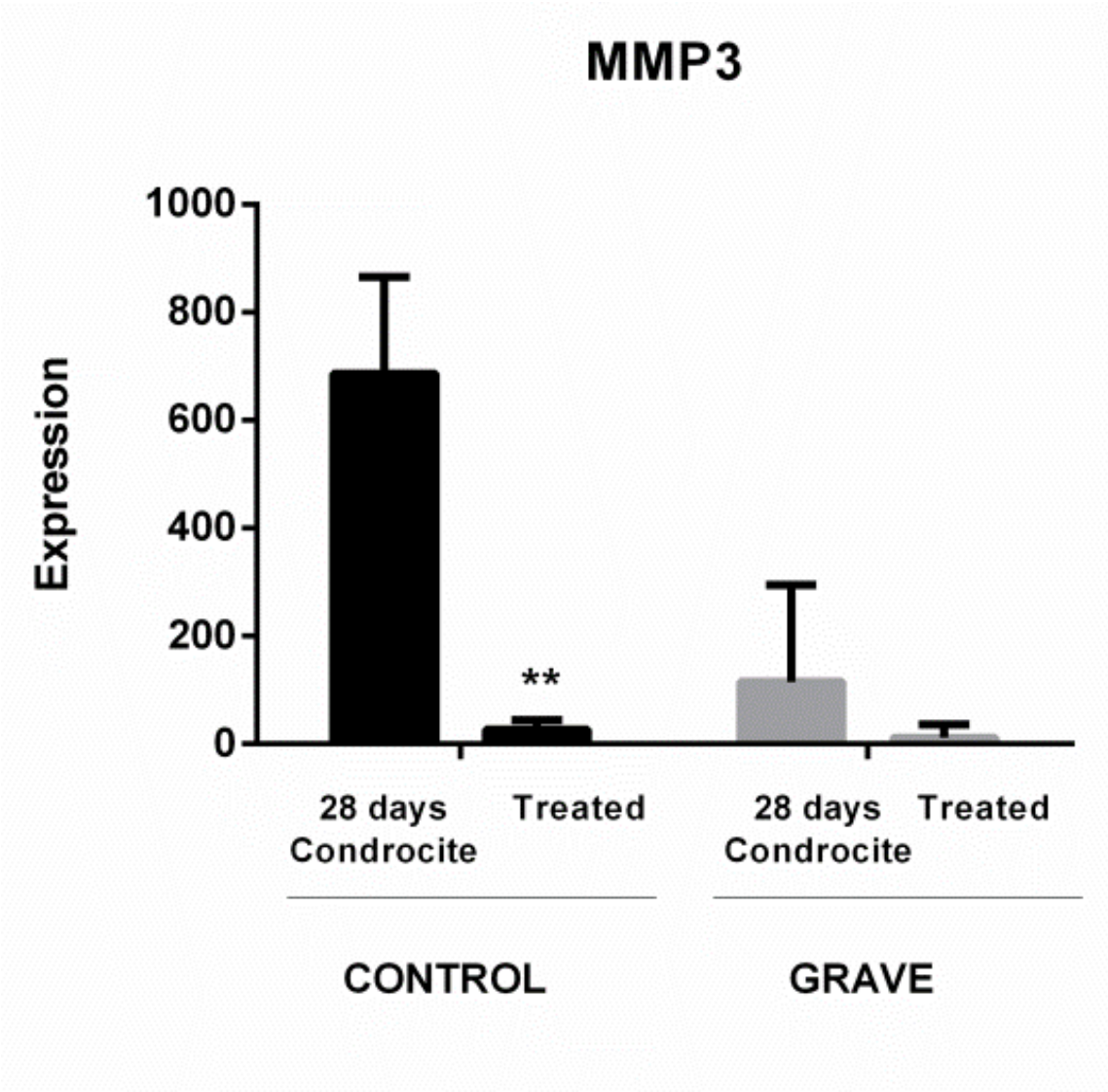


Tabla 23. Expresión comparativa de MMP3 en pacientes control y artrósicos al tratar los cultivos de condrocitos con líquido sinovial artrósico

---

MMP13

---

No se objetivó modificación en la expresión en ninguno de los grupos durante la fase de diferenciación. Sin embargo la adición de líquido sinovial artrósico produjo una importante elevación en el grupo control, no así en el grupo de estudio.

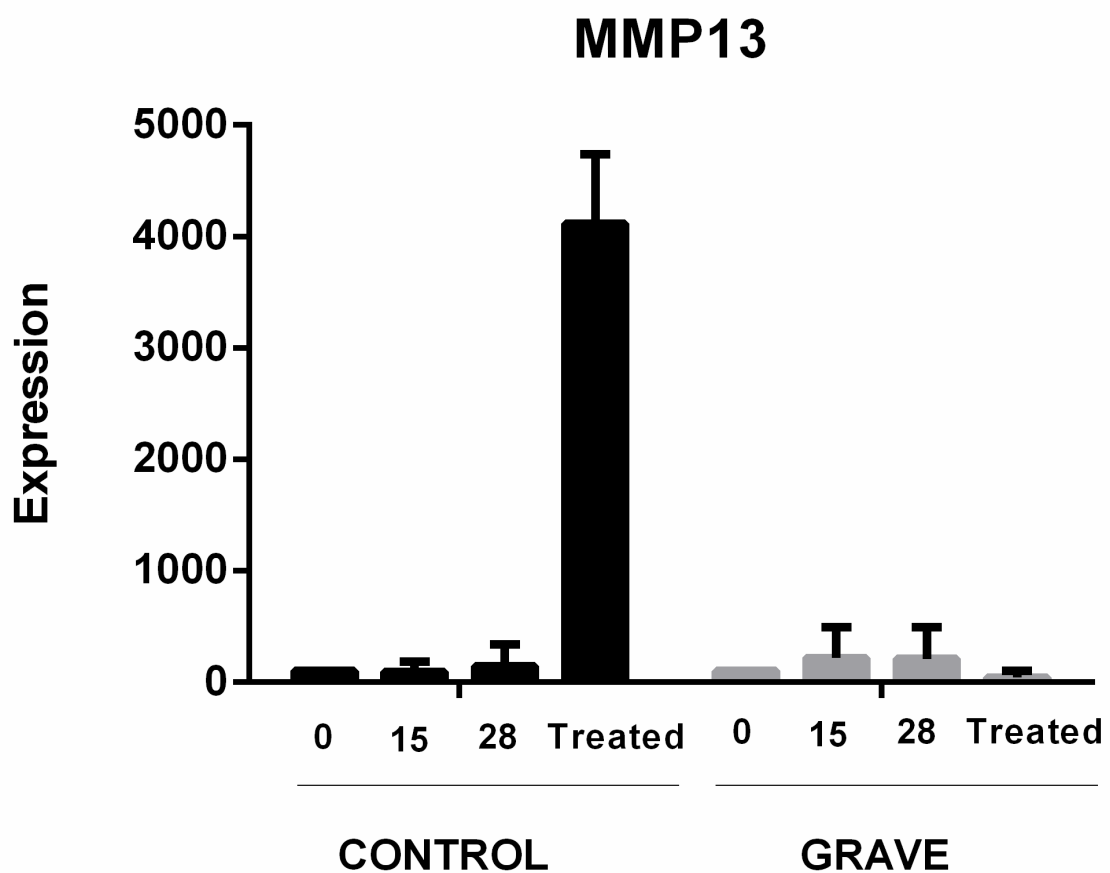


Tabla 24. Expresión de MMP13 en pacientes control y graves (artrósicos)

Comparando las expresiones, en cada momento de la diferenciación condrocitaria, de MMP13 observamos un aumento progresivo de la expresión tanto en el grupo control como artrósico. En el grupo control hay un mayor aumento, no significativo, el día 28 de cultivo.

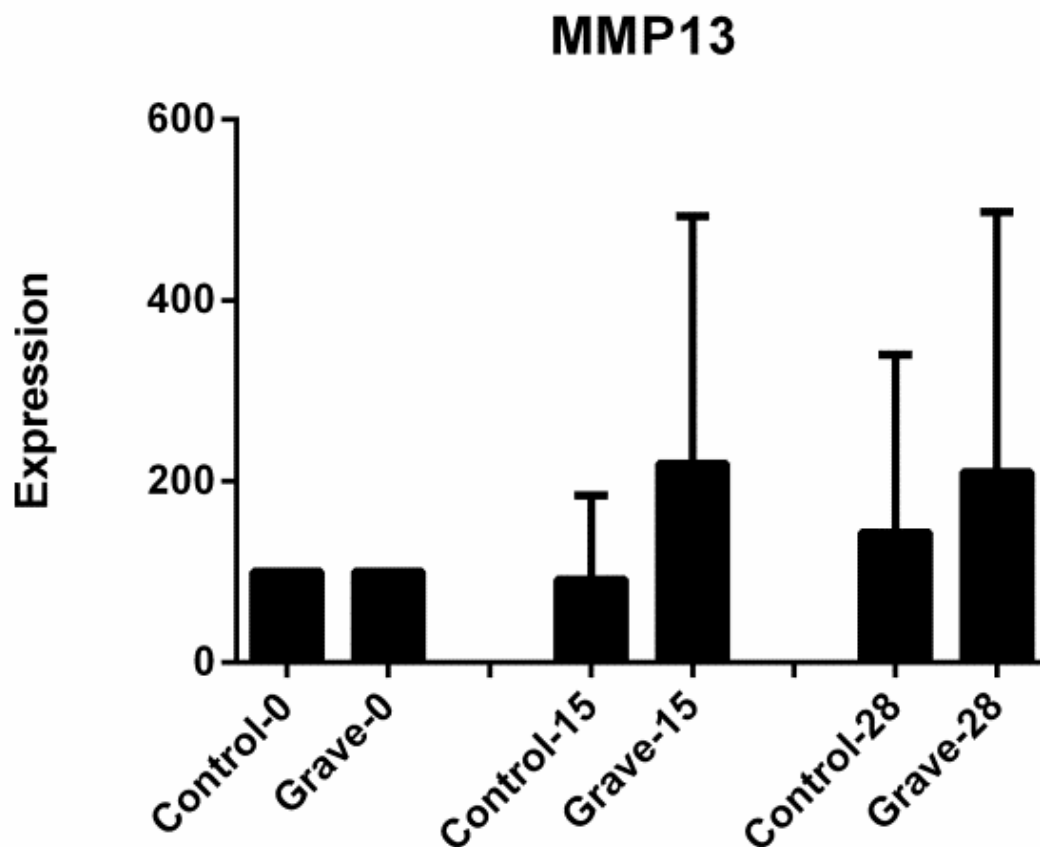


Tabla 25. Expresión comparativa de MMP13 en pacientes control y artrósicos durante el proceso de diferenciación a condrocito

La inclusión de líquido sinovial artrósico en el grupo control aumentó un 2860% la expresión de MMP13 ( $p < 0,01$ ), mientras que no afectó en el grupo artrósico frente a la expresión en el día 28.

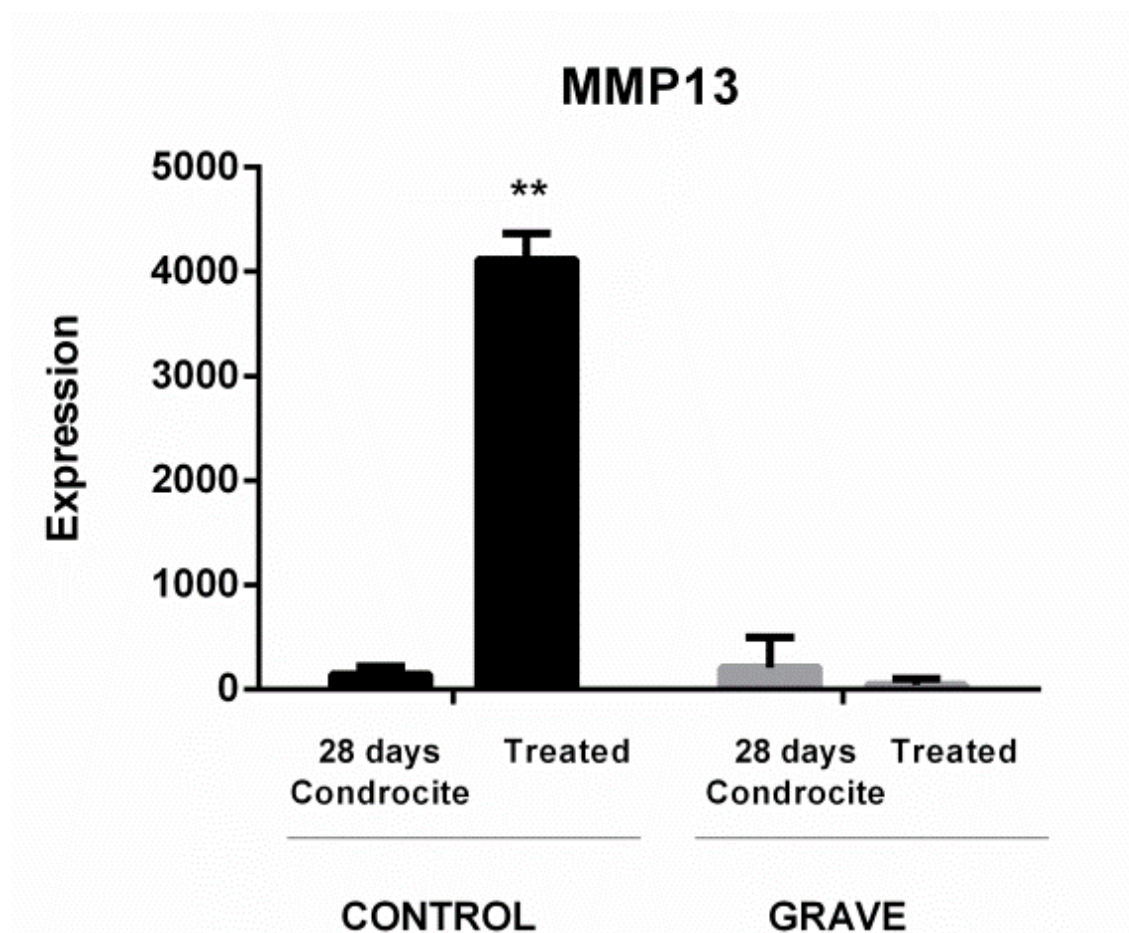


Tabla 26. Expresión comparativa de MMP13 en pacientes control y artrósicos al tratar los cultivos de condrocitos con líquido sinovial artrósico

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

	GRUPO CONTROL			GRUPO GRAVE		
BIOMARCADOR	D0	D15	D28	D0	D15	D28
OPG	100	<b>138,7</b> <i>(123,8)</i>	<b>183,7</b> <i>(148,1)</i>	100	<b>214,4</b> <i>(233,6)</i>	<b>24,1</b> <i>(26,4)</i>
PTH1r	100	222,7 (338,8)	420,4 (712,7)	100	332,7 (275)	323,9 (447,7)
FGF2	100	<b>218</b> <i>(297,6)</i>	<b>454,6</b> <i>(158,6)</i>	100	<b>34,9</b> <i>(65,44)</i>	<b>97</b> <i>(100,5)</i>
TGFb	100	<b>292,3</b> <i>(85)</i>	<b>181,9</b> <i>(98,7)</i>	100	<b>102,6</b> <i>(91,9)</i>	<b>75,4</b> <i>(89,6)</i>
MMP3	100	229,9 (410,9)	<b>686,8</b> <i>(440,5)</i>	100	123,2 (173,2)	<b>115,5</b> <i>(180,3)</i>
MMP13	100	92 (92,9)	143,8 (196,5)	100	219,6 (273,4)	210,5 (287,3)

Tabla 27. Expresión media y desviación estándar (DS) de todos los factores a largo del proceso de diferenciación (días 0,15 y 28) en µg/ml.

(En negrita y cursiva, diferencias con  $p < 0,05$ )

	GRUPO CONTROL			GRUPO GRAVE		
BIOMARCADOR	CONDROCITO	TTO LSV	p	CONDROCITO	TTO LSV	p
OPG	<b>183,7</b> <i>(148,1)</i>	<b>2618,8</b> <i>(562,3)</i>	<b>&lt;0,001</b>	24,1 (26,4)	75,1 (97,8)	>0,05
PTH1r	<b>420,4</b> <i>(712,7)</i>	<b>4113,2</b> <i>(625,2)</i>	<b>&lt;0,01</b>	<b>323,9</b> <i>(447,7)</i>	<b>39,3</b> <i>(60,6)</i>	<b>&lt;0,01</b>
FGF2	<b>454,6</b> <i>(158,6)</i>	<b>81,6</b> <i>(109,3)</i>	<b>&lt;0,01</b>	97 (100,5)	46,1 (97,5)	>0,05
TGFb	<b>181,9</b> <i>(98,7)</i>	<b>323,7</b> <i>(124,8)</i>	<b>&lt;0,05</b>	75,4 (89,6)	85 (97,6)	>0,05
MMP3	<b>686,8</b> <i>(440,5)</i>	<b>27,5</b> <i>(41,3)</i>	<b>&lt;0,01</b>	115,5 (180,3)	12,3 (24,2)	>0,05
MMP13	<b>143,8</b> <i>(196,5)</i>	<b>4113,2</b> <i>(625,2)</i>	<b>&lt;0,01</b>	210,5 (287,3)	41,9 (59,1)	>0,05

Tabla 28. Expresión media y desviación estándar (DS) de todos los factores antes y después de la adición de líquido sinovial (LSV) en µg/ml.  
(En negrita y cursiva, diferencias significativas)



# DISCUSIÓN

---





---

MOTIVO DEL ESTUDIO

---



---

ARTROSIS

---

La artrosis no se origina por un gen aberrante y no es la misma enfermedad en todos los pacientes; por el contrario, es un proceso de origen multifactorial donde, además, influye de manera directa una variable que es el tiempo pues, en principio, cuanto más tiempo haya transcurrido mayor será la gravedad del resultado y se requiere una progresión biológica, entre 10 y 20 años, desde un momento causal inicial. Durante ese periodo la enfermedad pasa por diferentes estadios hasta llegar al punto final que suele ser cuando se recomienda una solución quirúrgica, generalmente en las grandes articulaciones. Tanto el punto inicial como final concretos son, sin embargo, difíciles de definir (116).

Por otro lado no podemos olvidar que los condrocitos sufren un envejecimiento, “condrosenescencia” (117), como ocurre con todas las células del organismo, pero, en este caso, son incapaces de responder adecuadamente ante las agresiones mecánicas.

Contamos con dos nuevas herramientas diagnósticas en el estudio del paciente con patología degenerativa articular precoz como son la artroscopia y la RMN. Basándose en ellas, la ACR define como artrosis precoz, lo que Luyten et al. (118) llaman estadio inicial de la artrosis, al caso de la rodilla que cumple los siguientes tres criterios:

- Dolor

y

- Afectación radiológica según Kellgren-Lawrence radiográfico <2

y

- Ora hallazgos en RM según la escala WORMS (Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score), entre 3 y 6, o BLOKS (Boston Leeds Osteoarthritis Knee Score) o lesiones de la médula ósea; ora artroscópicamente, siguiendo la escala ICRS (International Cartilage Repair Society) I – IV en dos compartimentos o ICRS II-IV en un compartimento.

Esto llevado a la práctica clínica se podría resumir en: pacientes con dolor de rodilla con alteraciones radiológicas mínimas (sólo osteofitos), y al menos uno de los siguientes criterios estructurales: lesiones condrales identificadas por artroscopia o hallazgos en la RMN compatibles con degeneración articular condral, meniscal y/o cambios de señal en la médula ósea (118).

Sin embargo, los signos iniciales de una artrosis “temprana” se originan en el cartílago, correspondientes a un ICRS I o WORMS en RM que comprenden la degradación de la matriz extracelular o formación de osteofitos. Una radiografía en carga con un estadio Kellgren – Lawrence I significa cambios estructurales en la línea articular. Estos cambios necesitan un tiempo para desarrollarse. Es un estadio celular y molecular, que algunos autores le denominan “pre-artrósico” (116), que no repercute en la clínica ni en la función del paciente pero que terminan destruyendo la articulación.

No es de extrañar que cada día se conceda más importancia al concepto de “pre-artrosis”, cuando se dan los riesgos para que se produzca una artrosis

aunque no aparezcan las condiciones clínicas que la puedan definir (119) y que por desgracia no contamos con medios diagnósticos por la imagen o biomarcadores que nos puedan sugerir pautas terapéuticas para prevenir o curar el proceso degenerativo incipiente.

En la artrosis hay tres conceptos que se interrelacionan: Biología, Mecánica y Estructura. La biología comprende los factores que influyen en el metabolismo celular, inflamación y etiología genética. La mecánica comprende cualquier factor que libere un estímulo mecánico e incluye un amplio espectro de situaciones, desde la biomecánica corporal hasta la micromecánica que estimula el comportamiento celular. La mecánica es el componente más frecuente e importante que se basa en el equilibrio entre cuatro factores: la actividad, la alineación de los ejes y el movimiento articular, la carga y, por último, de nuevo el tiempo. Por último, la estructura incluye los factores que intervienen en la composición articular. Así una articulación “sana” o “normal” será aquella en la que todos los componentes biológicos, mecánicos o estructurales funcionan dentro de los rangos de normalidad (119,120). La alteración o exceso de uno de estos tres elementos prolongado en el tiempo conlleva alteraciones en la estructura articular.

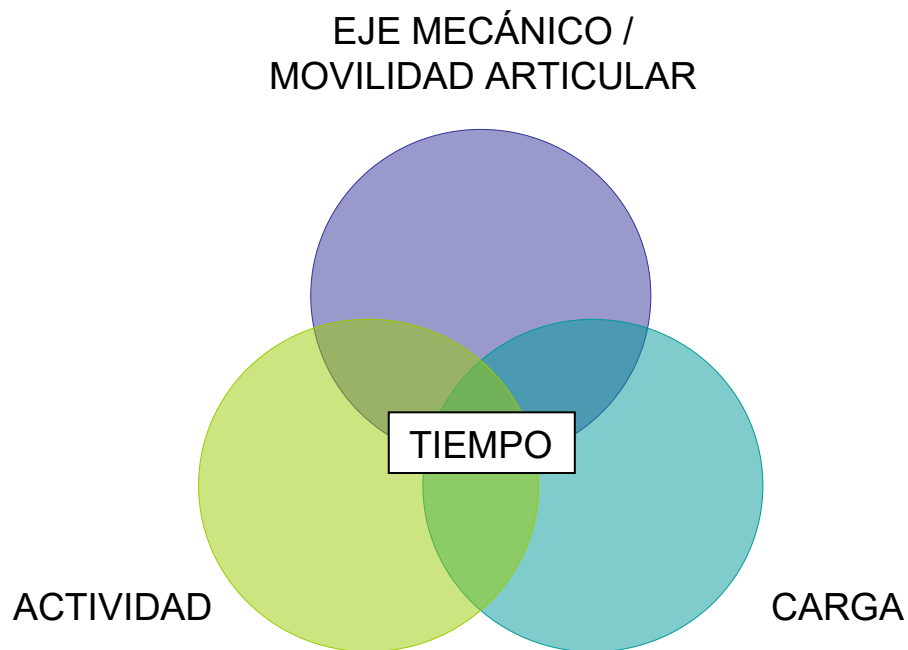


Fig.4 Factores “protagonistas” de la artrosis y su interrelación

La artrosis, según su etiología, puede clasificarse en cuatro grupos atendiendo a la respuesta que demos a dos preguntas clave, ¿es la causa principal congénita o adquirida?, y ¿es la causa principal biológica o biomecánica? (116). Así, combinando las respuestas tendremos:

- Grupo 1. Congénito – biológico: enfermedades del cartílago de crecimiento, colagenopatías, mucopolisacaridosis y alteraciones de los proteoglicanos.
- Grupo 2. Congénito – biomecánico: incluye la displasia de cadera, osteocondritis dissecans, rodilla en valgo o varo y otras condiciones predisponentes.

- Grupo 3. Adquirida – biológica: artritis reumatoide, sepsis.
- Grupo 4. Adquirida – biomecánica: el mayor grupo, debido a traumatismos condrales u osteocondrales o por rotura del ligamento cruzado anterior o meniscectomía. Incluimos aquí, fracturas con disimetría, secuelas postraumáticas con consolidación viciosa tanto extra como intraarticular.

La artrosis causada por la obesidad puede incluirse en dos grupos diferentes y es una causa de difícil valoración pues si bien la obesidad produce una sobrecarga que afecta al hueso subcondral provocando una degeneración del cartílago articular (121), también puede relacionarse con una actividad de la paratiroides y la calcitonina provocando una remodelación excesiva (122,123). Por ello, la obesidad se puede considerar un problema biomecánico pero también un factor biológico por la acción de las leptinas sobre el hueso subcondral y el cartílago articular (124). Sin embargo, ¿por qué en pacientes obesos también se ven afectadas articulaciones que no son de carga? (125). La grasa blanca (WAT) puede tener una función en la alta prevalencia de artrosis en personas obesas y se han estudiado las adipoquinas, moléculas derivadas de los adipocitos, y su relación con la homeostasis del hueso y del cartílago (126).

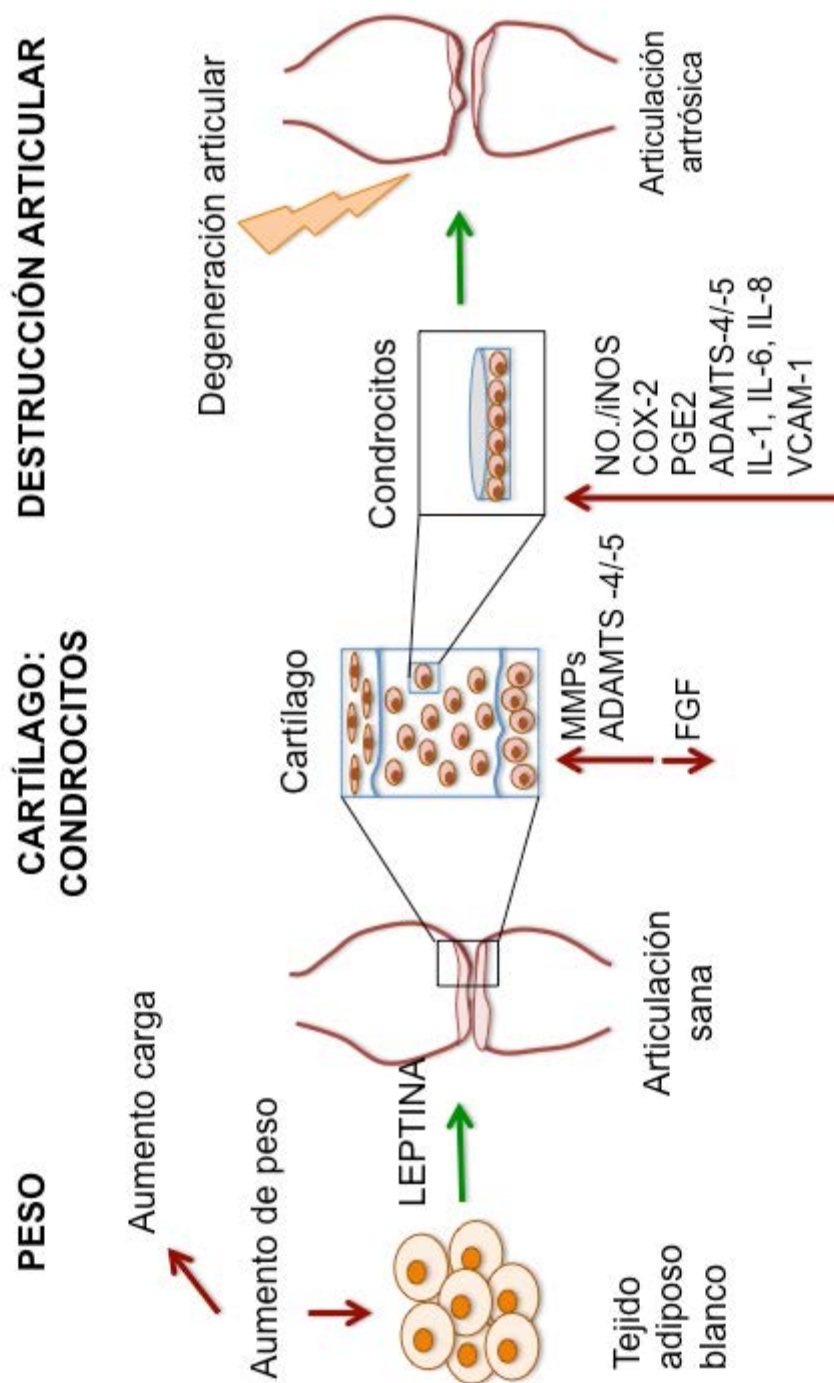


Fig.5 Mecanismo dual de la obesidad como “protagonista” en la OA: directo (carga excesiva) e indirecto (vía Leptinas).

Tomado de M. Scotece, A. Mobasheri. (119)

Hasta este momento hemos mostrado los elementos responsables de la artrosis y las distintas etapas y clasificaciones que se pueden hacer de ella. Pero conviene remarcar sobre qué estructuras intra y periarticulares se produce esta degeneración. Así pues, en la artrosis objetivamos:

- Una destrucción progresiva del cartílago articular mediada por distintos agentes enzimáticos.
- Una afectación del hueso subcondral sometido a una remodelación ósea con neoformaciones osteofitarias, esclerosis y quistes subcondrales.
- Una sinovitis asociada por afectación de la membrana sinovial.

Sin embargo se ha visto que no son las únicas dianas que sufren el proceso degenerativo, ya que lo padecen todas las estructuras intraarticulares como ligamentos, meniscos y de manera reciente, también la grasa de Hoffa, como veremos a continuación (127).

---

#### EL PAQUETE ADIPOSO DE HOFFA

---

El paquete adiposo de Hoffa está situado por detrás del ligamento rotuliano y por delante de la cara anterior de la extremidad proximal de la tibia. Es una estructura intracapsular pero, a su vez, extrasinovial y, además de los adipocitos, contiene macrófagos, linfocitos y granulocitos pero, también, como todo tejido adiposo contiene células mesenquimales pluripotenciales (MSC) que pensamos que, al igual que ocurre en otros tejidos grasos del organismo, podría ser un reservorio de fácil acceso para obtener MSC con fines terapéuticos. Por otro lado, la grasa de Hoffa contiene nociceptores



responsables del dolor anterior de rodilla al liberar estas fibras sustancia-P, mediador puede inducir la respuesta inflamatoria a través de la vasodilatación local con extravasación de células del sistema inmune (128).

Por otro lado, la grasa de Hoffa libera al líquido articular, mediadores como: citoquinas (bFGF, VEGF, TNFa), interleucinas (IL6), factores de crecimiento y adipocinas que controlan la expresión de MMP y citoquinas proinflamatorias que degradan la matriz extracelular condral y sinovial (129).

El grupo de Conde et al. (130) demostró que los niveles de adipocinas en líquido sinovial de pacientes artrósicos estaban elevados frente a controles sanos. Los tejidos en los que se encontraron mayores concentraciones de estos factores como visfatina, leptina y quemerina, fueron la grasa de Hoffa y la membrana sinovial. De este estudio se desprende la siguiente disyuntiva: es la grasa de Hoffa el agente iniciador del proceso degenerativo sobre la membrana sinovial, o es la membrana sinovial la que influye sobre la grasa de Hoffa primariamente para su degeneración, o por el contrario se trata de un proceso simultáneo. Intentando responder a estas cuestiones, Eymard et al. (131), tomaron muestras de grasa de Hoffa, grasa del celular subcutáneo y de membrana sinovial de pacientes artrósicos. Se cultivaron las muestras por separado y tras un periodo de incubación, se tomó el medio de cultivo de las muestras de Hoffa y de celular subcutáneo y se añadieron por separado a los cultivos de sinovial. Se objetivó la escasa respuesta al tejido adiposo extraarticular. Sin embargo, el medio de grasa de Hoffa provocó la sobreexpresión de factores degenerativos (IL6 y 8, PGE2, COX-2, MMP1-3-9-13). De aquí se desprende que la grasa de Hoffa juega un papel inductor sobre

la membrana sinovial en el proceso degenerativo a expensas sobre todo de la PGE2.

Según Ioan-Facsinay (132), la grasa de Hoffa tiene un comportamiento doble en la rodilla. Por un lado, presenta un papel protector disminuyendo la concentración de NO, la liberación de glucosaminoglicanos y la expresión de MMP1 en el cartílago; así mismo presenta MSC y macrófagos de características antiinflamatorias. Y, por otra parte, presenta actividad inflamatoria en forma de cambios en la RMN en procesos inflamatorios (133), máxime si asocian lesión del LCA aumentando la liberación de citocinas proinflamatorias con la ganancia ponderal de peso como factor de riesgo de daño condral, induciendo la fibrosis sinovial a través de mediadores adiposos como las oxylipinas (134), leptina, quemerina o visfatina (135) que estimulan la proliferación de células Th1 y aumentando la expresión de metaloproteinasas (MMP1, MMP13).

A nivel macroscópico la grasa de Hoffa se modifica en función del grado de degeneración condral como demostró el grupo de Ding (136), al relacionar de manera directamente proporcional y negativa el área máxima del depósito graso y los cambios estructurales y clínicos articulares de las rodillas de pacientes, principalmente mujeres (137).

En nuestro estudio hemos querido analizar la interrelación de distintos elementos que intervienen en la homeostasis articular, de cuyo equilibrio depende, a nivel molecular, la supervivencia y normal funcionamiento del tejido condral, centrándonos en la influencia sobre este nuevo actor que es el paquete adiposo de Hoffa. Así pues, por primera vez en la literatura científica, hemos analizado, por un lado el papel que juegan una serie de biomarcadores

procedentes de MSC de grasa de Hoffa y por otro el papel del líquido sinovial ante agentes dañinos (128).

---

## BIOMARCADORES ESTUDIADOS

---

En una revisión efectuada en 2013, en pacientes con artrosis de cadera y rodilla, deja bien claro que no se ha determinado ningún biomarcador que pueda utilizarse para el diagnóstico y pronóstico de esta patología (138).

Recientemente se ha tratado de utilizar la lesión y posterior reparación del LCA como modelo animal in vitro de simulación de estado preartrósico para determinar los marcadores en líquido sinovial que se sobreexpresaban en estas condiciones (139). Por eso, los pacientes intervenidos de lesiones meniscales y del LCA se han considerado que padecían un estado preartrósico por lo que han recibido la atención de diferentes grupos de trabajo (139). En modelos animales se demostró que algunas de las citoquinas proinflamatorias elevaban su respuesta en caso de lesión tisular, posiblemente relacionado con la cicatrización de las heridas mediada por los leucocitos ya que este proceso aumenta en la nocicepción del dolor por medio de las citoquinas sensibilizadoras de los nociceptores que inervan el tercio externo del menisco humano (140). Por su parte, Brenn et al. (141) mostraron que la IL-6 puede sensibilizar las fibras-C nociceptivas que inervan la articulación de la rodilla en la rata, posiblemente mediante la inducción de la vía inflamatoria de la ciclooxigenasa-PG-E<sub>2</sub>.

Cuellar et al. (142) estudiaron el perfil de las citoquinas proinflamatorias en pacientes con dolor agudo de rodilla secundario a la lesión meniscal.

Recogieron muestras de líquido sinovial en rodillas de 23 pacientes, sin artritis reumatoide y con dolor de rodilla de evolución menor a 6 meses. Como grupo control se obtuvieron muestras de líquido sinovial de la rodilla contralateral y de pacientes asintomáticos. Se realizó igualmente un estudio de imagen con RNM, que junto con los valores de las citoquinas, fueron comparados con los resultados intraoperatorios de la artroscopia. En los resultados se observó una mayor concentración de ocho citoquinas inflamatorias en las rodillas sintomáticas comparado con las asintomáticas. Cuatro de estas citoquinas, (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1 o proteína quimiotáctica del monocito tipo 1), tuvieron una correlación positiva significativa respecto a los resultados de dolor, y se hallaron de forma más consistente en las rodillas sintomáticas. Sin embargo, el perfil de citoquinas inflamatorias no estuvo presente en las rodillas sin lesión meniscal asintomáticas identificadas igualmente en el estudio de RNM. También Higuchi et al. (12) demostraron que la concentración de IL-6 permanecía elevada en el líquido sinovial de la rodilla con lesión del LCA durante las 50 semanas tras la lesión. Estas observaciones son prometedoras de cara a desarrollar una prueba diagnóstica precisa, rápida y económica.

IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  son las citoquinas que mayor relación guardan con la artrosis, tanto en su origen como en su desarrollo, pero también se sobreexpresan en otros procesos articulares, por lo que enfocamos nuestro estudio a otros factores que pudieran ser tan sensibles como los previos pero más específicos.

En nuestro estudio hemos medido expresiones de 6 factores: 2 anabólicos del hueso (OPG, PTH1r), otros 2 del cartílago (TGFB y FGF2) y dos factores catabólicos (MMP3 y MMP13). Esta selección de factores se debe a

que la artrosis es un proceso degenerativo multinivel, ya que afecta al hueso subcondral, al cartílago, a la membrana sinovial (principal productor de líquido sinovial) y a la luz de los resultados de este estudio también a la grasa de Hoffa, al haber realizado estas determinaciones a partir de condrocitos derivados de MSC procedentes de esta masa adiposa intraarticular.

## OPG

---

La OPG o factor inhibidor de la osteoclastogénesis es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (143). Carece de dominio transmembrana. Se trata de un propéptido de 401 aa (144). Presenta diferencias con respecto a RANKL y el RANK cuya expresión es restringida. En el caso de OPG se expresa en altas concentraciones por gran variedad de tejidos y tipos de células. En hueso, la OPG se produce por células de la línea osteoblástica, con aumento de la producción en células mas diferenciadas. La OPG actúa como un receptor señuelo, neutralizando el RANKL. In vitro la OPG inhibe la diferenciación y fusión de las células precursoras osteoclasticas, bloqueando la activación de osteoclastos maduros e induciendo su apoptosis (145).

La sobreexpresión de OPG en ratones transgénicos se asocia con la osteopetrosis, de manera similar a lo que ocurre en ratones sin RANK y sin RANKL. Sin embargo, la disminución de la expresión de OPG se asocia a cuadros graves de osteoporosis, asociando aumento importante de la actividad osteoclastica, como también un depósito óseo arterial severo, lo que indica el papel protector de la osteoprotegerina en el sistema vascular (146).

La administración parenteral de OPG recombinante en ratones normales produce aumento de la masa ósea y previene la pérdida ósea inducida por ooforectomía sin los efectos colaterales esqueléticos y extraesqueléticos. Esta acción también es mediada por la leptina, una proteína secretada por la masa grasa corporal, que estimula la producción de OPG (147).

Con respecto al papel que juega la OPG en la artrosis, Ramos et al. han demostrado que puede ser una diana terapéutica en determinados tipos de artrosis como la asociada a la condrocalcinosis en la que se objetiva una mutación del dominio TNFRSF11B que inhibe la osteoclastogénesis y la resorción ósea (148). Por su parte, Tat et al. (149) demostraron que durante las fases iniciales del proceso degenerativo articular se produce una afectación conjunta de cartílago y hueso subcondral. Este último presenta dos poblaciones bien diferenciadas de osteoblastos. Por un lado las que llamó de bajo metabolismo en los que el ratio OPG/RANKL era bajo, lo que indicaba que en dichas regiones predominaba la actividad osteoclástica favoreciendo la resorción ósea y por otro lado, la población de elevado metabolismo con un ratio OPG/RANKL elevado lo que traducía una actividad osteoformadora elevada, en un intento del propio tejido óseo por reparar las lesiones previas.

### PTH1R

---

El receptor 1 de la parathormona es una proteína que está codificada por el gen *PTH1R* en el hombre. PTH1R funciona como un receptor para la hormona paratiroidea (PTH) y para la proteína relacionada con la PTH (PTHrP), también llamada hormona similar a la hormona paratiroidea (PTHrH)

(150). Este receptor se expresa en elevadas concentraciones en hueso y riñón, regulando la homeostasis calcio-fósforo a través de la activación de la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C . En el hueso, se expresa en la superficie de los osteoblastos y cuando el receptor es activado por la PTH, los osteoblastos expresan RANKL (activador del receptor del factor nuclear kB ligando), que se une a RANK (activador del receptor del factor nuclear kB) sobre los osteoclastos estimulando la reabsorción ósea (151).

Es un miembro de la familia de los receptores de la secretina acoplados a la proteína G . La actividad de este receptor está mediada por proteínas G que activan la adenilato ciclasa y la fosfatidilinositol – calcio, segundo mensajero sistema (152).

Los defectos en este receptor son conocidos por ser la causa de la condrodisplasia metafisaria de Jansen (JMC), condrodisplasia tipo Blomstrand (BOCD), así como encondromatosis y el fracaso primario de la erupción de los dientes (153).

El papel que juega el receptor de parathormona en la artrosis fue demostrado en conejos por Becher quien generó lesiones potencialmente artrógenas en las rodillas de estos animales y los siguió en el tiempo frente a un grupo control. Objetivó una relación inversamente proporcional y con significación estadística entre el grado de daño articular y la concentración de PTH1r (154). Así mismo, Yan et al. (155) demostraron que el tratamiento con 1-34 PTH a un modelo artrósico de cerdos, retrasaba las alteraciones articulares degenerativas a expensas de mejorar el estado del hueso subcondral a través de un aumento en los niveles de OPG y de PTH1r.

Al final del desarrollo embrionario de las articulaciones se ha observado que el PTH1r se expresa en la región periarticular por la proliferación de condrocitos y células pericondrales. El receptor de la PTH no se expresa en células indiferenciadas pero se sobreexpresa en las MSC que se diferencian a condrocitos (156). La proteína *Indian hedgehog* (IHH) también estimula la producción de PTH1r en la fisis periarticular. La IHH está muy relacionada con la condrogénesis pues estimula la proliferación y diferenciación de condrocitos así como en el desarrollo de la artrosis (157,158)

## FGF2

---

También conocido como factor de crecimiento fibroblástico básico. En el tejido normal, este factor está presente en la membrana basal y en la matriz extracelular subendotelial de los vasos sanguíneos . Se mantiene en estas situaciones, siempre y cuando no haya ningún péptido de señalización (159).

Se ha planteado la hipótesis de que, tanto durante la cicatrización de heridas de tejidos normales como durante el desarrollo tumoral, la acción de las enzimas que degradan el heparán sulfato activa este factor de crecimiento, mediando por lo tanto la formación de nuevos vasos sanguíneos , un proceso conocido como angiogénesis (160).

Además, se sintetiza y se secreta en el hombre en el tejido adiposo por lo que la concentración de FGF circulante se correlaciona con el índice de masa corporal. Kühn et al. demostraron que FGF2 aumentaban la proliferación de los



preosteoblastos. Este mecanismo está mediado por la unión al receptor del FGF1 y la activación de la fosfoniositol 3 quinasa (161).

FGF 2 parece actuar como agente protector, en animales, ante lesiones miocárdicas, reduciendo la superficie tisular lesionada y mejorando la función cardíaca tras la reperfusión (162). Además, FGF2 juega un papel crítico en el cultivo de células madre embrionarias; el factor de crecimiento es necesario para que las células se mantengan en un estado indiferenciado, aunque los mecanismos por los cuales hace esto no están bien definidos. Induce la expresión de la proteína Gremlin (Grem1) la cual juega un papel antagónico de las proteína morfogenéticas óseas (163). FGF2, junto con BMP4 , promueven la diferenciación de las células madre para hacia tejidos mesodérmicos. Después de la diferenciación, los medios de cultivo celulares a partir de células pluripotenciales a los que se les añade BMP4 y FGF2, generalmente producen cantidades más altas de células de líneas osteogénica y condrogénica. Además optimiza las propiedades mecánicas del tejido condral obtenido (164–166).

Chia et al. han demostrado su papel como agente protector del tejido condral al depleccionar ratones transgénicos del gen productor de FGF2, provocando el desarrollo acelerado de artrosis en sus articulaciones en el plazo temprano de 3 meses frente a los ratones sin alterar genéticamente (167). Siguiendo esta línea, este grupo de trabajo determinó los niveles de FGF2 en rodillas de animales de experimentación a los que por un lado se les sometió a sobrecarga mecánica excesiva, como por otro lado se les produjeron lesiones condrales de manera intencionada, viendo cómo en ambas situaciones se sobreexpresaba FGF2 en líquido sinovial (168).

## TGFB

---

La vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta participa en gran cantidad de procesos celulares del ser humano adulto como durante embriogénesis incluyendo el crecimiento celular, la diferenciación, apoptosis u homeostasis celular. A pesar del amplio número de integrantes de esta “superfamilia”, el proceso de señalización es relativamente sencillo. Los ligandos se unen al receptor tipo II, que recluta y fosforila a un receptor tipo I. Este receptor fosforila a otro receptor regulado por el sistema SMADs (R-SMADs) que se une a coSMAD/SMAD4. El complejo receptor coactivador SMAD se acumula en el núcleo donde actúa como factor de transcripción y participa en la regulación de la expresión génica diana (169).

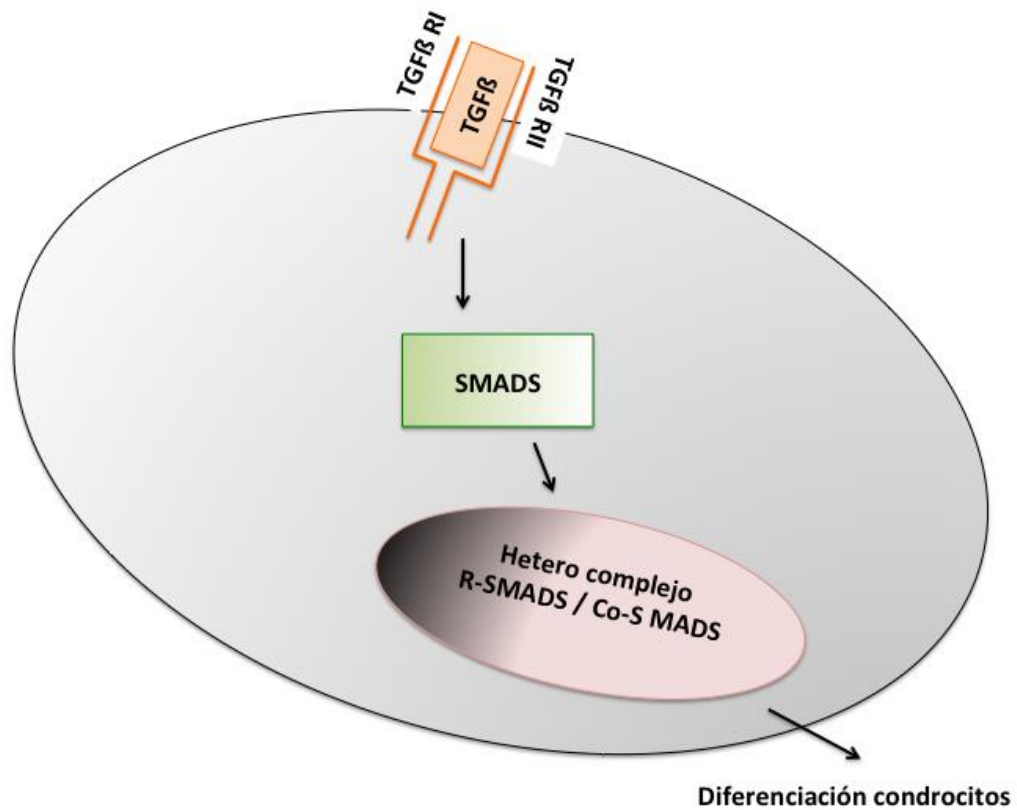


Fig.6 El patrón de señal del factor TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  se une al receptor TGF- $\beta$ -RII. Después de unirse al TGF- $\beta$ , el TGF- $\beta$ -RII recluta y fosforila TGF- $\beta$ -RI, llevando a la activación de la Smad-2 y Smad-3 por fosforilación. Este proceso puede ser inhibido por la Smad 6/7.

La activación de Smad-2 y Smad-3 se forman heterodímeros con Smad-4 y translocan el núcleo. Junto con otros activadores, copresores y otros factores de transcripción, el complejo Smad regula la expresión génica. Adaptado de Augustyniak et al. (94)

Esta “superfamilia” de ligandos incluye: BMPs, factores de crecimiento y diferenciación (GDFs), Hormona antimülleriana (AMH), activina, nodal y TGFb. Cada ligando tiene un receptor específico y en mamíferos se han diferenciado 7 del tipo I y 5 del tipo II. Hay 3 tipos de activina: A, B, AB. Intervienen en la embriogénesis y osteogénesis. También regulan varias vías endocrinas como: hipofisaria, gonadal, hipotalámica e insulínica. También son protectoras de las células neurales. Las BMPs intervienen en la osteogénesis, diferenciación celular, crecimiento y homeostasis. Se han definido 3 tipos de TGFb: 1,2,3. Al igual que las BMPs comparten funciones anabólicas, pero también interviene en fenómenos de apoptosis. Nodal se une al receptor de la activina A para actuar de manera local en lo que se conoce como señalización paracrina (170).

El TGFb en la articulación parece tener un papel reparador de lesiones, no sólo en el tejido condral sino también a nivel meniscal (171,172). Ye et al. publicaron que cuando las MSC de grasa de Hoffa eran cultivadas en presencia de TGFb3 y BMP6, éstas se diferenciaban a condrocito, adquiriendo una configuración espacial en vectores de quitosán que podrían ser usados como injerto osteocondral (173). A su vez, recientemente el grupo de Su ha demostrado que una de las posibles vías del papel condroprotector de este marcador es debido a la inducción de expresión de TIMP3 que produce en el condrocito, lo que podría justificar, en parte, las diferencias que hemos observado en el comportamiento de MMP3 y MMP13 en nuestro estudio (174).

## MMP3

---

La familia de las MMP interviene en la degradación de la matriz extracelular durante procesos fisiológicos como la remodelación y el desarrollo embrionario, así como en procesos patológicos como son la artrosis o la invasión metastásica tumoral. La mayoría de las MMPs son secretadas como proproteínas inactivas. Su activación depende de la escisión enzimática por las proteinasas extracelulares (175).

La estromelisina-1, también conocida como metaloproteína tipo 3 de la matriz. Está codificada por el gen MMP3 que se localiza en el cromosoma 11q22.3, formando parte de un cluster de genes de MMP. La MMP3 degrada las variedades de colágeno II, III, IV, IX y X, así como proteoglicanos, fibronectina, laminina y elastina. Además puede activar otras MMP como la 1, 7 y 9, convirtiéndose en piedra angular de la remodelación del tejido conjuntivo: reparación de heridas, progresión de la aterosclerosis e invasión tumoral (176), y a nivel nuclear actúa como factor de transcripción y proteinasa (175).

El papel que juega la MMP-3 en el desarrollo de la artrosis ha sido nuevamente resaltado por Uchida et al., que la señalan junto con TNF- $\alpha$  como responsables de la asociación tradicional entre las hiperlipidemias, obesidad y artrosis (177).

## MMP13

---

La colagenasa tipo 3 es una enzima que en el humano se codifica por el gen MMP13. Como la mayoría de las MMPs se secreta en su forma inactiva. Posteriormente se activa dejando expuestos 2 dominios: catalítico y el similar a

hemopexina (PDB: 1PEX). Aunque su mecanismo de actuación no es bien conocido en la actualidad, parece que sólo el segundo dominio es efectivo en la degradación del colágeno. Durante el desarrollo embrionario se expresa en el esqueleto para reestructurar la matriz de colágenos para permitir la mineralización ósea. En situaciones patológicas como los carcinomas, la artritis reumatoide y la artrosis se produce su sobreexpresión (178,179).

Ha cobrado protagonismo al ser clave en el metabolismo de la matriz extracelular del cartílago en pacientes con artrosis al formar parte del sistema ERK y mTOR en PLC $\gamma$ 1-mediada por MMP-13 y su relación con la COX2 (180).

A la luz de los resultados obtenidos, se confirma que no todas las MMP son iguales. Prueba de ello, MMP-1 es la única MMP capaz de degradar el colágeno nativo, intacto e intersticial mientras que las dos gelatinasas (MMP2 y 9) rompen las moléculas de colágeno desnaturalizado y la membrana de colágeno tipo IV. Las estromelisininas (MMP3, 10 y 11) degradan la matriz proteica no colagénica pero también desnaturaliza el colágeno.

MMP1, 8, 13 y 18 son las únicas enzimas capaces de romper las moléculas de colágeno intersticial (181). MMP1 y 13 pueden degradar directamente colágeno tipo II intacto. La MMP13 es 10 veces más activa en la digestión del tipo II que otras colagenasas (182).

Haller et al. (182) vieron, en el líquido sinovial de articulaciones que habían sufrido un traumatismo, que la MMP3 estaba elevada, así como la 1, 9, 10 y 12 mientras que esto no ocurrió con la MMP13, lo que sugiere que la MMP13 deja actuar a otras citoquinas inflamatorias y MMP para la sobreexpresión y no actúa en los momentos iniciales, sino interviniendo en

procesos crónicos (183,184). MMP13 es la collagenasa más agresiva y su presencia es tardía después de un traumatismo (182).

La incorporación de IL1b en los cultivos de condrocitos aumenta la producción de MMP1 y MMP13 (185).

En la artrosis la degeneración del cartílago es, inicialmente, el hecho más llamativo con una pérdida de los componentes de la matriz extracelular incluyendo agreganos y colágeno II. El agregano es el mayor proteoglicano encontrado en el cartílago articular y se rompe en la articulación degenerada como consecuencia de la acción de las agreganasas y las MMP (186).

Además, las MMP también pueden degradar el colágeno tipo II en fragmentos grandes que pueden ser posteriormente degradados por las gelatinasas (187).

---

## PAPEL DE LAS MSC EN LA ARTROSIS DE RODILLA

---

Caplan (188) define las MSC como “células de señalización médica”, capaces de liberar un cóctel de factores tróficos e inmunomoduladores sobre un tejido lesionado. Esto se puede aplicar a las lesiones articulares pues se dan dos fenómenos, la inflamación y la degeneración donde pueden trabajar las MSC y como demostró Matsukura (189) al observar la elevación de la concentración de las MSC durante la fase inflamatoria post-lesional en la rodilla (190,191).

Sekiya et al. (192) han demostrado que las MSC derivadas de la sinovial inyectadas en la articulación se adhieren a la lesión, diferenciándose en células meniscales y apoyando la reparación de la lesión (193,194). Cuando hay una lesión intrarticular del tipo que sea, las MSC se movilizan desde la sinovial al líquido sinovial y se adhieren en la lesión (193,195–197). En el caso de lesiones meniscales, el grupo de Matsukura (189) demostró que cuando comparaban las concentraciones de MSC en líquido sinovial de pacientes con lesión meniscal que iban a ser sometidos a cirugía artroscópica para proceder a su resección parcial eran mucho mayores que las de voluntarios sanos.

Las MSC derivadas de la sinovial en lesiones meniscales pueden tener dos posibles orígenes: bien el sangrado inicial, ya sea de la lesión meniscal o bien de las lesiones asociadas, o bien por lesión condral. Así mismo estas células tienen dos funciones para reparar una lesión meniscal, diferenciarse en células meniscales y producir factores tróficos. En esta línea De Bari et al. (198) establecieron estrategias con MSC para reparar tejidos articulares e



incluso Fox et al. (199) introdujeron MSC de la sinovial como fuente para la regeneración del cartílago y del menisco. Morito et al.(200) y Sekiya et al. (195) demostraron que el número de MSC en el líquido sinovial proveniente de rodillas con una lesión del LCA y con artrosis era mucho mayor que en rodillas sanas. A este último punto hace especial mención el trabajo publicado por Lee (164), en el que descubren que en procesos degenerativos se produce una sobreexpresión de la proteína de zona superficial (SZP) a manos de TGF- $\beta$  y BMP-7 sobre las MSC de la grasa de Hoffa. Esto traduce un mecanismo de autorregulación dependiente de la grasa de Hoffa, en cuanto a que la SZP es un factor clave en la “lubricación límite” del cartílago articular. Además, el perfil genético de las MSC del líquido sinovial era tan cercano al de las MSC de la sinovial que las procedentes de la médula ósea (201). Así, inyectando MSC en rodillas de ratas y conejos con una lesión meniscal, se adhieren a la lesión, diferenciándose a células meniscales directamente o produciendo factores tróficos (193,194) y si las inyectamos junto con PRP en humanos tras desbridamiento artroscópico de lesiones condrales, se objetiva una mejoría clínica a largo plazo, si bien es cierto que sin diferencia estadística con respecto al grupo control en los que sólo se inocularon PRP sin MSC.

La hemorragia articular puede disparar el aumento de MSC en el líquido sinovial, sangre que permanece en la articulación durante algunos días, y esto puede explicar el aumento de factores anabólicos que se han encontrado en el líquido sinovial de rodillas con una rotura del LCA frente a rodillas con condropatías o lesión meniscal. Martínez Albornoz et al. (202), analizaron 62 muestras de líquido sinovial de rodillas con afección meniscal, rotura del ligamento cruzado anterior y lesión condral aislada. De cada muestra se realizó

un estudio cuantitativo y cualitativo de las citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) y factores de crecimiento (IGF-1, TGF- $\beta$ ). En la lesión del LCA, el ambiente del LS fue predominantemente anabólico e inflamatorio, con niveles elevados de IL1, IL6, significativos de TGF- $\beta$ , IL-10 y significativamente disminuidos de TNF- $\alpha$ . En la afección condral y meniscal, predominó un ambiente catabólico, con elevación significativa del TNF- $\alpha$  y disminución significativa del TGF- $\beta$ . Las diferencias fueron mayores en el caso de la lesión condral aislada mostrando que en la lesión articular, además de la alteración biomecánica, el líquido sinovial influye negativamente en la homeostasis articular, variando su composición según el tipo de afección. Además, no hemos de olvidar que la lesión vascular y el sangrado promueven la expresión de citoquinas y quimioquinas quienes, consecuentemente, reclutan las MSC.

La inflamación puede afectar a las MSC del líquido sinovial aumentando su número en una primera fase si bien no se mantiene durante mucho tiempo (189) lo cual también está relacionado con la hemorragia que se produce después de una lesión. Sin embargo, nos planteamos que si esto fuera así no se desencadenaría un proceso degenerativo, tan frecuente después de una lesión articular. Podemos sospechar que hay, por una parte, un intento regenerativo de los tejidos articulares pero que no puede durar mucho tiempo. Además, algunos de los tejidos de una articulación están muy vascularizados (sinovial, paquetes adiposos), otros están vascularizados (LCA, porción roja del menisco) pero también hay otros que son claramente avasculares (cartílago, porción blanca del menisco) y, por lo tanto, el nivel de MSC halladas en el líquido sinovial dependerá mucho de donde se localice la lesión.

Arnoczky et al. (203) conocedores del papel del hematoma en la fase inicial de la reparación meniscal aplicaron un coágulo de fibrina en las lesiones meniscales en región avascular. Este coágulo parece guiar la respuesta intrínseca meniscal reparativa actuando como conductor y como fuente de factores estimulantes. Este punto fue respaldado por Mauck en cerdos y Zhang en humanos (204,205), que al exponer colonias de fibrocondrocitos a los factores de crecimiento del coágulo de fibrina se incrementó la proliferación y la síntesis de matriz condral.

Las células sinoviales además de capacidad proliferativa y de diferenciación (198), son fuente de células pluripotenciales (206) con mayor capacidad condrogénica que osteogénica. En condiciones apropiadas de estimulación son capaces de migrar hacia el cartílago dañado y diferenciarse en esta línea. Por ello además desempeñan un papel importante en la integración de los injertos.

El origen de las células reparativas permanece aún incierto, pero la presencia precoz de fibroblastos, le otorga un papel preponderante a las células superficiales meniscales y a las células sinoviales como fuentes de células madre. Las primeras parecen participar en la cicatrización superficial de las lesiones condrales y las segundas en la cicatrización profunda a través de los canales que se labran en el tejido meniscal durante las técnicas de reparación (205). Parece claro que además de la estabilidad mecánica inicial es básico un medio biológico adecuado con un correcto aporte vascular.

Dado que las MSC, en función del estímulo al que se vean sometidas, son capaces de diferenciarse a diferentes tejidos, recientemente ha cobrado gran interés el uso de sustancias intraarticulares que estimulen su

diferenciación, como demuestra la utilización de membrana sinovial en forma de injerto o de flap en el interior de la lesión meniscal, como demostraron Cisa et al. (207) en estudios con conejos. Este colgajo sirve como aporte vascular y como estímulo para las células pluripotenciales, facilitando la cicatrización profunda. A pesar de mejorar las tasas de cicatrización, las propiedades mecánicas del menisco cicatrizado permanecen reducidas con respecto al sano.

A su vez se han realizado inyecciones intraarticulares de MSC sinoviales alogénicas en cerdos con lesiones meniscales importantes con resultados prometedores en cuanto a la regeneración y protección del cartílago femoral (193).

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios se han centrado en las MSC derivadas de la membrana sinovial. Sin embargo existe un reciente interés en el papel que desempeña la grasa de Hoffa en la homeostasis articular y en la producción de MSC.

Es conocido desde hace tiempo que el tejido adiposo, condral y óseo comparten progenitores comunes. Esta situación se da en el mismo espacio en la rodilla. Además la accesibilidad a dicha localización hace de esta articulación el lugar en que centrar toda la experimentación y desarrollo en este campo en busca de posibles fuentes para la reparación condral y osteocondral (208).

Analizando en detalle el papel de las MSC procedentes de la grasa de Hoffa, se ha demostrado su papel en cirugía reconstructiva en lo que a tejido adiposo se refiere (209). No obstante, el perfil condrogénico y su capacidad de diferenciación hacia tejido condral, de manera especial y superior en comparación con otras fuentes de tejido adiposo como el celular subcutáneo,

ha sido expuesto por diferentes grupos de trabajo como el de Lopa y Moretti (210), que objetivaron que las MSC procedentes de Hoffa se diferenciaban hacia tejido condral mejor que las procedentes del celular subcutáneo que se diferenciaban mejor hacia tejido óseo.

Sin embargo, cuando comparamos el tejido condral diferenciado a partir de MSC procedentes de grasa de Hoffa con el tejido condral nativo, como ya hicieron Vinardell T. et al. (211) en cerdos, se observó que la composición en lo que a contenido celular y matriz extracelular se refiere era similar, sin embargo su distribución espacial y su comportamiento funcional difería, quizás este segundo punto debido a la diferencia en el primero. A la luz de este estudio se desprende que el “gold standard” en lo que a reparación tisular condral se refiere sigue siendo el cultivo de condrocitos, si bien es cierto que dicha técnica presenta morbilidad en la zona donante como ocurre en aquellos que se diferencian a partir de aspirado de médula ósea. Sin embargo no está claro qué pronóstico tiene la toma de muestras de grasa de Hoffa, existiendo versiones contrapuestas (212,213).

No obstante el trabajo de Liu pretendió mejorar las funcionalidad mecánica de estos injertos desarrollados a partir de MSC grasa de Hoffa artrósica. Para ello aplicaron presión hidrostática al cultivo. Dicho gesto parece alterar la agrupación espacial de los condrocitos haciendo la estructura más compacta, si bien es cierto, estos cultivos seguían siendo deficitarios en hidrogeles comparados con el cartílago nativo (214).

---

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

---

---

### ESTUDIO PRELIMINAR DEL PAPEL PROTECTOR DEL LÍQUIDO SINOVIAL

---

Es conocido desde la década de los 60 el papel que juega el líquido sinovial como lugar de detección de productos de degradación de la matriz condral en el proceso degenerativo artrósico. En estos últimos 50 años se ha seguido analizando los componentes del líquido sinovial en busca de mejorar su composición para optimizar su función en la fase final de la vida articular de los pacientes. Así mismo, como ya hemos comentado previamente, las líneas actuales de investigación tratan de buscar en el líquido sinovial el marcador por excelencia que o diagnostique la artrosis en un estadio incipiente o que sea la diana terapéutica biológica contra la que actuar para frenar el proceso degenerativo.

El líquido sinovial juega un papel importante en la nutrición de las estructuras intraarticulares (202,215). Maroudas et al. y Martínez Albornoz et al. demostraron que los niveles de factores anabólicos eran mayores en líquido sinovial de pacientes que se someten a reconstrucción de LCA vs el grupo de pacientes sometidos a menisectomía. Las reparaciones meniscales realizadas de manera simultánea con una reconstrucción del LCA tenían tasa de reparación mayor que si se hacía de manera aislada. Sin embargo poco está documentado sobre el uso del líquido sinovial humano como medio de cultivo de líneas de condrocitos. En nuestro estudio hemos querido analizar el efecto

que genera el líquido sinovial de pacientes artrósicos en cultivos de condrocitos a partir de tejido condral maduro y su papel protector ante agentes químicos agresivos.

Siguiendo esta línea, en nuestro estudio nos basamos en los estudios previos de Kim et al. que demuestran el efecto que tiene el etopósido en los cultivos condrales (216). Éste induce la apoptosis de los condrocitos mediante la escisión de la polimerasa poli (ADP-ribosa) (PARP). Este grupo al estudiar un modelo in vitro de artrosis, descubrió que la apoptosis que inducía el etopósido era muy similar a la que ocurría en los condrocitos en rodillas degeneradas artrósicas. Por ello se utiliza hoy en día como modelo de artrosis en laboratorio.

Del mismo modo, han sido muchos los grupos que en el afán por encontrar un remedio efectivo para la artrosis, hayan utilizado sobre este modelo in vitro, distintas terapias con su posterior análisis de supervivencia condral. El propio grupo de Kim probó el papel del cilostazol como agente que aumenta la resistencia del condrocito frente a la agresión del etopósido. Este efecto lo consigue transformando los condrocitos en sus formas senescentes arreactivas.

Ahora bien, los grupos de estudio buscan un agente protector frente a la artrosis que no modifique ni la estructura ni las características biomecánicas del tejido al que se busca proteger, por lo que moléculas como el cilostazol han sido abandonadas. Es por ello que han surgido modelos que buscan moléculas condroprotectoras como el ácido hialurónico.

En nuestro estudio preliminar expusimos cultivos de condrocitos a distintos medios de cultivo. Lo novedoso de nuestro estudio consistía en hacer

uso de líquido sinovial artrósico, a diferencia de estudios previos que utilizaban líquido sinovial de articulaciones no degeneradas. El objetivo era estudiar el papel que juega el líquido sinovial de pacientes artrósicos en primer lugar como medio de cultivo y en segundo lugar como agente protector frente a agentes agresivos. La variable evaluada era el porcentaje de células vivas.

Estos condrocitos procedían de cartílago maduro de pacientes que iban a ser sometidos a una artroplastia total de rodilla con el diagnóstico de artrosis primaria. Se distinguieron 3 brazos de estudio. Por un lado el grupo control fue cultivado en medio de cultivo estándar. Los grupos de estudio fueron cultivados con líquido sinovial de 2 pacientes distintos.

Objetivamos un mayor porcentaje de células vivas con diferencias significativas entre el grupo control y el grupo cultivado con líquido sinovial del paciente nº 03, favorable a este segundo grupo. También ocurrió lo mismo entre los 2 grupos de estudio y en el mismo sentido. No hubo diferencias entre el grupo de estudio con líquido sinovial del paciente nº 02 y el grupo control.

Posteriormente expusimos a los 3 brazos del estudio a un agente dañino como es el etopósido. En esta ocasión el porcentaje de células vivas disminuyó en los 3 grupos, demostrando el potencial lesivo del etopósido. Sin embargo este descenso fue significativamente menor en los grupos de estudio frente al grupo control. No hubo diferencias entre ambos grupos de estudio.

De aquí se desprende que el líquido sinovial, aun en el caso de muestras procedentes de pacientes artrósicos, o a través de las sustancias que contiene, ejerce un papel protector frente a agentes dañinos. También llama la atención que los líquidos presentan comportamientos diferentes en función del paciente del que procedan, aunque el diagnóstico en ambos casos el



diagnóstico sea de artrosis primaria. Analizando los datos demográficos de cada paciente, en lo que se refiere a edad, sexo, IMC, antecedentes personales, nivel de actividad, etc., no encontramos diferencias significativas entre ambos. Ejemplos como este, refuerzan la teoría de que la artrosis es un fenómeno degenerativo individualizado. Es decir no hay 2 pacientes con artrosis iguales, lo que hace que tratar de diseñar un modelo clínico universal para el estudio de la misma, sea prácticamente imposible.

---

## DIFERENCIACIÓN DE MSC DE HOFFA A CONDROCITOS. MARCADORES. REACCIÓN A LÍQUIDO SINOVIAL ARTRÓSICO

---

Dado que en la primera parte del estudio ya habíamos demostrado que el líquido sinovial artrósico servía como medio de cultivo y agente protector frente a agresiones químicas, en esta segunda fase quisimos analizar el efecto de su adición a cultivos de condrocitos de diferente origen al cartílago maduro para intentar explicar el mecanismo de esta acción. Ensayos con MSC derivados de médula ósea ya habían sido estudiados ampliamente, así como con los derivados de grasa subcutánea. Sin embargo con aquellos procedentes de grasa de Hoffa, no existían datos fiables sobre su comportamiento.

Por otro lado, ya era sabido, como hemos expuesto previamente en la discusión, que los condrocitos obtenidos a partir de MSC de grasa de Hoffa, presentaban una estructura celular similar a los de tejido condral maduro, si bien es cierto que algunos autores creen que tanto la matriz como su distribución espacial es diferente, por lo que su comportamiento es distinto.

Es por ello que nos planteáramos cómo la adición de líquido sinovial artrósico modifica la expresión de factores claves en la homeostasis articular, en función de si la procedencia de MSC era de pacientes con o sin artrosis diagnosticada de manera estandarizada. Este análisis resulta novedoso en la literatura científica ya que es la primera vez que se estudia la interrelación entre el líquido sinovial artrósico y condrocitos derivados de MSC de grasa de Hoffa con el objetivo de evaluar el papel de la almohadilla grasa en el proceso

degenerativo articular, midiendo, para ello, la expresión de distintos marcadores anabólicos y catabólicos.

Se hicieron mediciones a los 0, 15, 28 días y tras la administración de líquido sinovial. El cultivo parte de células mesenquimales del paquete adiposo de Hoffa y se diferencian durante el cultivo (28 días) a condrocitos. En medio del proceso hay cambios importantes, pasa por condroblasto, que desconocemos, que hacen que la expresión en el cultivo intermedio (día 15) sea muy distinta.

El comportamiento de los factores anabólicos óseos es muy semejante objetivando un aumento progresivo de su concentración en ambos grupos de estudio hasta la adición líquido sinovial. En este momento se produce una elevación exponencial de ambos factores en el grupo control y un descenso en el grupo de estudio de PTH1r y se mantiene en OPG.

Los agentes anabólicos condrales responden de manera similar en el grupo no artrósico a lo largo del proceso de diferenciación, objetivando un aumento progresivo de su expresión de manera significativa frente al grupo de estudio. Sólo la adición de líquido sinovial provocará alteración significativa en el grupo control, aunque de manera inversa, en la concentración de FGF2 de manera negativa y TGFb de manera positiva. Llama la atención este comportamiento tan distinto entre 2 factores con una finalidad, a priori, común. Pero este fenómeno es debido a la gran diferencia existente entre ambos factores, en cuanto a estructura, mecanismo de acción, etc., así como el lugar de medición de los biomarcadores en nuestro estudio no se realiza en líquido sinovial como en estudios previos, sino por expresión directa celular, por lo que

nuestros resultados no son comparables con lo expuesto en la literatura previamente en lo que se refiere a FGF2.

Las metaloproteinasas se comportan de manera diferente. En el caso de MMP3 se eleva su concentración en pacientes del grupo control. Sin embargo, en el grupo de estudio se mantiene constante. La adición de líquido sinovial disminuye su concentración en ambos grupos siendo muy llamativa en el grupo control. Es posible que la presencia de TIMPS en mayor concentración en el grupo control sea responsable de este comportamiento. Además estas TIMPs han de ser más específicas para MMP3 que para MMP13 ya que aun siendo dos metaloproteinasas de matriz similares, sólo esta variable puede explicar tan diferente comportamiento tras la adición de líquido sinovial.

En el caso de MMP13, sucede como pasa en los factores osteogénicos, aumento progresivo en el grupo control incrementándose de manera muy notable con la adición de líquido sinovial. En el grupo de estudio, se experimenta un descenso de la concentración de MMP13 al añadir líquido sinovial.

El aporte de líquido sinovial generalmente aumenta la expresión del factor en los grupos control, salvo FGF2 y MMP3, mientras que se inhibe o no aumenta la expresión en el grupo artrósico.

Esta situación podría llevar a plantearse dos hipótesis como posible explicación del fenómeno, si bien es cierto que tras revisar la bibliografía disponible en el momento actual, no se ha encontrado respaldo para ellas, y por tanto podría ser motivo de ampliación del estudio. La primera es que la presencia mantenida de determinados factores a lo largo del proceso degenerativo saturan los receptores de las células de pacientes artrósicos,

mientras que las células de pacientes sanos aún no se han visto expuestas a dichos factores y por tanto muestren un aumento de la expresión al verse expuestos a líquido sinovial artrósico cargado de estos factores.

La segunda hipótesis se basaría en que las células degeneradas sean metabólicamente menos activas que las sanas y por tanto les influya poco el medio en el que viven y por tanto no les afecte la adición de líquido sinovial artrósico.

En línea con esta última hipótesis, se ha objetivado que durante el fenómeno de envejecimiento, sin artrosis, disminuye la concentración sinovial de IGF-1 al 50% de la de un control joven, y además, disminuye un 30% la actividad condral frente a este factor de crecimiento. Sin embargo, este fenómeno de manera aislada no es capaz de producir artrosis.

Hasta la fecha se sabe que el líquido sinovial artrósico presenta niveles más elevados que el líquido sinovial no artrósico de factores degradantes del tejido condral como IL-1, IL-6, etc. (217). Igualmente sabemos que su efecto es concentración dependiente y que no todos los pacientes, aun con cambios degenerativos en Rx similares, se encuentran en la misma fase de su proceso degenerativo, por lo que las concentraciones varían. Este tipo de biomarcadores parecen estimular la vía del TNF $\alpha$ . Es por ello que nos planteamos si los condrocitos derivados de MSC de grasa de Hoffa podrían ser un reducto celular que aun en un medio artrósico, fueran capaces de responder a las agresiones externas bien porque no se vean afectados por recluirse en un ambiente ajeno o bien porque posean algún tipo de respuesta específica frente a ello. El primero de estos planteamientos ha sido descartado en este estudio porque hemos demostrado que la grasa de Hoffa no está aislada del medio en

el que vive. No es pues un reducto al que la artrosis no afecta puesto que el comportamiento de las células de pacientes artrósicos es diferente al de las de pacientes sin artrosis. A la luz de nuestra investigación, en la mayoría de ocasiones lo harán de manera silente, arreactiva frente a la adición de líquido sinovial artrósico. Tampoco parece que tengan ninguna respuesta específica frente al fenómeno degenerativo como le ocurre al condrocito maduro ya que expresan estos condrocitos marcadores similares a los derivados de cartílago maduro, y en concentraciones similares. Es por ello que deducimos que la grasa de Hoffa es otra pieza más en el puzzle de la artrosis de rodilla.



# APLICACIÓN CLÍNICA DE NUESTRO ESTUDIO Y FUTURAS LÍNEAS DE TRABAJO

---





La artrosis es un proceso degenerativo y complicado que no puede ser comprendido como consecuencia de una alteración estructural o celular bien diferenciada. Por el contrario, son muchas las causas que intervienen y muchos los elementos que se ven alterados. Nuestro estudio ha demostrado que, además de lo ya conocido hasta el momento, hay estructuras extrasinoviales que también se ven alteradas como es, en nuestro caso, el paquete adiposo de Hoffa. Siempre se ha pensado que el paquete adiposo tenía una función mecánica pero con nuestro estudio podemos pensar que también puede servir como un reservorio de células mesenquimales (MSC) y que en momentos iniciales puede tener una función reparadora. Este trabajo nos abre nuevas líneas de investigación, pues seguimos trabajando para conocer cómo actúan las MSC tratadas con técnicas de bioingeniería y terapia génica sobre los procesos degenerativos iniciales. Pensamos que sería un proceso sencillo y poco agresivo de restaurar la función articular y regenerar el cartílago alterado.

---

### MSC: INOCULACIÓN/TRASPLANTE DE HOFFA

---

La capacidad osteogénica y condrogénica de las MSC es bien conocida desde los inicios de la investigación en este campo. El sistema musculoesquelético procede del mesoderma, al igual que las MSC presentes en médula ósea, lo que proporciona una ventaja teórica en cuanto a la consecución de la diferenciación de estas células en tejidos de dicho sistema. Estas propiedades, sobre todo la capacidad para favorecer la formación de hueso y la facilidad de obtención a partir de aspirados de médula ósea, son

bien conocidas por los cirujanos ortopédicos, quienes han aprovechado el potencial de estas células para aplicarlas en el tratamiento de diversas enfermedades del hueso y las articulaciones desde hace décadas. Es por tanto factible pensar que el campo de la Cirugía Ortopédica y Traumatología es el que más se ha beneficiado del uso de las MSC en terapia, como lo demuestran la gran cantidad de estudios publicados en relación a la aplicación en casos de pseudoartrosis, necrosis avascular, defecto óseos , cartílago articular, artrodesis articular quirúrgica, osteogénesis imperfecta.

No obstante, la mayoría de los avances al respecto se hayan hoy en día en fase preclínica, por lo que el campo de desarrollo e instauración de nuevas terapias es prometedor. Esta evolución está siendo lenta por la dificultad para diseñar ensayos clínicos de calidad. Los principales escollos con los que nos encontramos los localizamos en las siguientes 4 etapas del tratamiento con MSC:

- Producción de progenitores y precursores.
- Estructura: construcción de matrices y vectores que faciliten el crecimiento y adhesión celular.
- Inducción: estudio de citoquinas, factores de crecimiento y proteínas de señalización celular.
- Aclimatación: aplicación de fuerzas biomecánicas que optimicen los constructos (218).

Es por todas estas características por las que una estructura intraarticular de la rodilla, la grasa de Hoffa, ha cobrado gran relevancia últimamente no sólo como productor de MSC y enzimas sino como órgano fundamental en la homeostasis condral de la rodilla. Además, en comparación

con el sistema tradicional de obtención de las MSC, de la médula ósea, las MSC derivadas de tejido adiposo, como el Hoffa, presentan las siguientes ventajas:

- son más abundantes (5% de células nucleadas en tejido graso frente a menos del 0,1% en médula ósea)
- son más fáciles de obtener con menor morbilidad local
- se expanden más rápido y en mayor cantidad
- conservan su estructura en mayor número de pases (219).

Se sabe que existen MSC en la grasa de Hoffa pues han sido utilizadas en numerosos estudios para que mediante estimulación enzimática sean capaces de demostrar su capacidad regenerativa ante lesiones condrales, meniscales o tendinosas/ligamentosas (218).

A nivel meniscal se demostró que la inoculación de MSC, en rodillas de cerdos, a los que se les había producido una meniscectomía parcial bilateral, producía mayor regeneración meniscal (220).

A nivel tendinoso, existe poca evidencia al uso de las MSC. La gran mayoría de los mismos suelen asociar el uso de las MSC con la aplicación de plasma rico en plaquetas (PRP) que sí ha demostrado aumento de la tasa de cicatrización tras reparación tendo-ligamentosa (221).

A nivel condral es donde mayor número de estudios encontramos. Existe gran disparidad en lo que a métodos de dispensación (vehículos para las MSC), dosis e indicaciones, todo ello tapizado con el velo de períodos escasos de seguimiento (222).

Para resolver algunos de estas trabas, como es la de la dispensación y garantizar una mejoría clínica de los pacientes con artrosis de rodilla a los que se les inoculan MSC derivadas de grasa de Hoffa se ha utilizado PRP y ácido hialurónico (223,224). Sin embargo, surge la duda sobre si la mejoría se debe a las MSC o al efecto del vehículo, puesto que ambos han demostrado estos efectos en pacientes. Sin embargo, previamente Centeno et al, demostraron que la inoculación aislada de MSC, sin vehículo, disminuía el dolor y aumentaba el grosor del cartílago en pacientes con gonartrosis (225,226).

Con respecto a la dosis mínima efectiva, parece que  $10^8$  células es la cantidad mínima de MSC para reparar lesiones condrales (227).

Desconocemos la evolución de esta técnica con una larga evolución. Esto nos hace plantearnos si el trasplante de grasa de Hoffa podría ser una solución más duradera que las inyecciones repetidas de MSC. Sin embargo, no conocemos el medio y la forma en la que viven y se relacionan estas células en la masa grasa de Hoffa. Es en este punto donde nos surgen gran cantidad de dudas sobre su homeostasis y su interrelación fisiológica con el resto de estructuras ya no sólo de la rodilla sino del resto del organismo, y no sabemos si son capaces de salir de la rodilla y viajar por el organismo como se ha demostrado con otras MSC de otras localizaciones bien conocidas como la cresta ilíaca. Tampoco podemos precisar si son más numerosas en la grasa de Hoffa o en la cresta ilíaca. Preguntas sobre qué situaciones las estimulan, cómo llegan a las zonas lesionadas, son transportadas o se movilizan de manera independiente, cuánto resisten en el líquido sinovial, hacen que trabajos como el que presentamos en esta tesis traten de arrojar luz a estos enigmas, así como abrir puertas a futuras investigaciones.

Hopper et al. ponen de manifiesto el papel de las células mononucleares de sangre periférica, como las encargadas de favorecer la diferenciación a cartílago y su migración de las MSC de grasa de Hoffa a las lesiones condrales en la rodilla, adquiriendo un papel clave en el diseño de las nuevas estrategias biológicas para la reparación condral (228).

### CITOQUINAS: ANTICUERPOS Y TERAPIA GÉNICA

---

Estudios como éste, si bien iniciales, nos llevan a plantearnos la posibilidad de diseñar dianas terapéuticas biológicas, bien mediante terapia génica que module la expresión de factores, o bien mediante anticuerpos, que inhiban o estimulen determinados procesos enzimáticos intraarticulares. De esta forma podríamos actuar, a modo de símil automovilístico, como acelerador y freno de los procesos protectores y degenerativos respectivamente de la artrosis, en función de la situación en la que se encuentre en ese momento la articulación.

Pi et al. se han centrado en el factor  $2\alpha$  inducible por hipoxia (Hif- $2\alpha$ ) como una de las dianas a bloquear para frenar la aparición de la artrosis en presencia de lesiones potencialmente artrógenas como es la inestabilidad articular. Para ello desarrollaron in vitro un modelo animal, ratón, al que produjeron una lesión ligamentosa. Posteriormente inocularon nanopartículas cargadas con RNA de interferencia menor (si-RNA) para silenciar el efecto de este factor dirigidas hacia los condrocitos. Objetivaron una disminución de la expresión de los marcadores que habitualmente desencadenan la cascada de la degradación articular (metaloproteinasas (MMP-13, -9), ADAMTS-4, -5,

VEGF, IL-1 $\beta$ , etc.). A nivel macroscópico se observó menor inflamación sinovial que en los ratones control a los que no se inocularon las nanopartículas, así como la integridad del cartílago articular (229).

Para el diseño de moléculas que bloqueen el proceso degenerativo, Olson et al. utilizaron la artrosis postraumática, que en humanos sólo afecta al 12% de los pacientes, como modelo clínico en ratones. Para ello provocaron una fractura en la meseta tibial y la dejaron sin tratar. Como control usaron ratones sanos. Objetivaron que el marcador que más se elevaba era la IL-1 al compararlo con rodillas sanas. Diseñaron una molécula capaz de bloquear el efecto de la previa. A esta molécula la llamaron antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1ra) viendo que su acción en la articulación evitaba la aparición de artrosis en los ratones (230).

---

## PERFIL GENÉTICO

---

Por otro lado, si volvemos al esquema de conjuntos previamente presentado (FIG. 4), no podemos dejar de lado que la artrosis tiene un componente genético que predispone a la degeneración articular como se ha demostrado en las publicaciones, llegando hasta el 60-70% de los casos (231).

Es por ello que desde hace unos años existen en el mercado distintos sistemas de diagnóstico molecular para el desarrollo de herramientas tecnológicas que permitan personalizar y optimizar el tratamiento de cada paciente. Estas pruebas se encuadran en una corriente médica cada vez más extendida como es la medicina personalizada basada en el conocimiento del genoma humano.

Uno de los modelos que más lleva en el mercado español es el Arthotest® (Bioibérica S.A., Barcelona, España). Se trata de una prueba genética en saliva basada en el análisis de marcadores genéticos específicos (SNP) y validada clínicamente que permite conocer la predisposición de cada paciente a sufrir una progresión rápida de la artrosis primaria de rodilla. De esta manera se podría plantear un esquema preventivo o terapéutico, si ya está establecida la artrosis, más personalizado y adaptado al riesgo de progresión de la enfermedad.





# LIMITACIONES DE NUESTRO ESTUDIO

---



Nos encontramos con múltiples limitaciones en nuestro estudio.

En primer lugar el número de muestras empleadas es bajo: 6 del grupo artrósico y 6 del grupo control. Las determinaciones que hemos llevado a cabo son costosas y por tanto hubo una limitación económica a la ampliación del estudio que pudiera haber reflejado mayores diferencias con significación estadística donde hasta la fecha no las hemos encontrado.

En segundo lugar, si el líquido articular artrósico tiene un papel protector, ¿cómo sería el líquido no artrósico? No se ha comprobado, ya que el volumen de líquido sinovial en pacientes sanos es escaso y difícil de extraer.

En tercer lugar, hemos de señalar que aunque hemos definido al grupo control como aquel compuesto por pacientes sin artrosis, los controles no son 100% sanos porque acuden a quirófano por dolor de rodilla aunque todavía no seamos capaces de diagnosticar cambios degenerativos. Además, éticamente no sería posible.

En cuarto lugar, cabe reseñar que el sexo predominante en cada grupo pudiera constituir un sesgo de selección, si bien es cierto que la selección se realizó atendiendo únicamente al cumplimiento de los criterios de inclusión. El hecho de que el azar haya querido que nuestros grupos tengan esta uniformidad genérica puede explicarse porque la prevalencia de la artrosis de rodilla oscila entre 1,5 - 4 veces más frecuente en mujeres que en hombres. Mientras que las lesiones no degenerativas de rodilla relacionadas con la actividad del paciente, como las elegidas en el grupo control, son más prevalentes en hombres que en mujeres.

Por último hemos de resaltar una limitación a todos los trabajos que versan sobre artrosis en humanos. El diagnóstico de la artrosis se realiza de

manera radiológica, ya que es el único método no invasivo validado hoy en día. Tampoco las escalas de valoración tienen la sensibilidad y especificidad suficientes para encontrar diferencias y establecer grupos de trabajo. Por ello, hemos de tener presente la gran disociación entre el aspecto clínico, anatómico y radiológico que presenta la enfermedad. De ahí que a día de hoy, no exista en la literatura médica un modelo clínico que sirva de manera fiable para el estudio de la artrosis en humanos, hasta tal punto, que algunos autores llegan a plantear la posibilidad de que cada paciente sufra “su” propia artrosis como proceso final de la interrelación personalizada de los factores expuestos previamente en el diagrama de conjuntos.

# CONCLUSIONES

---



- I. Se confirma que el líquido sinovial de una rodilla artrósica contiene sustancias que pueden hacer de mensajeras y protege los cultivos condrocitarios derivados de la superficie condral expuestos a sustancias dañinas como el Etopósido.
- II. Hemos demostrado que las células mesenquimales multipotenciales del paquete adiposo de Hoffa se diferencian a condrocitos, tanto si proceden de rodillas gravemente artrósicas (grupo estudio) como si proceden de rodillas sin artrosis (grupo control).
- III. Los condrocitos derivados de células mesenquimales multipotenciales del paquete adiposo de Hoffa expresan factores anabólicos del cartílago (FGF-2 y TGF $\beta$ ) y del hueso (PTHr1 y OPG) así como catabólicos (MMP-3 y MMP-13) de manera diferente en ambos grupos. En todos los casos, en el grupo control hay una tendencia a que aumente la expresión en el día 28 de cultivo, mientras que no encontramos variaciones en el cultivo de condrocitos artrósicos. Únicamente, la MMP3, se comportó al contrario, no varió en el grupo control aumentando su expresión el día 28 en el cultivo de condrocitos artrósicos.
- IV. La adición de líquido sinovial de pacientes artrósicos a cultivos condrocitarios procedentes de células mesenquimales pluripotenciales del paquete adiposo de



Hoffa modifica la expresión de los factores en el cultivo de condrocitos controles (aumenta la expresión de OPG, PTH1r, TGFb, factores relacionados con el hueso, y disminuye la expresión de FGF2, MMP13 y MMP3), sin mostrar variaciones en los condrocitos artrósicos.

- V. Este estudio demuestra que la artrosis grave en la articulación de la rodilla también afecta a las células mesenquimales del paquete adiposo de Hoffa, que es un nuevo actor, hasta ahora no mencionado, en el proceso degenerativo artrósico, y que puede contribuir al origen, instauración y progresión de la enfermedad.

# BIBLIOGRAFÍA

---



1. Sokoloff L. Elasticity of aging cartilage. *Fed Proc.* 1966 Jan;25(3):1089–95.
2. Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* 1987 Aug;30(8):914–8.
3. Fazalare JA, Griesser MJ, Siston RA, Flanigan DC. The use of continuous passive motion following knee cartilage defect surgery: a systematic review. *Orthopedics.* 2010 Dec;33(12):878.
4. Shelbourne KD, Jari S, Gray T. Outcome of untreated traumatic articular cartilage defects of the knee: a natural history study. *J Bone Joint Surg Am.* 2003 Jan;85-A(Suppl 2):8–16.
5. Indelicato PA, Bittar ES. A perspective of lesions associated with ACL insufficiency of the knee. A review of 100 cases. *Clin Orthop Relat Res.* 1985 Sep;198:77–80.
6. Zamber RW, Teitz CC, McGuire DA, Frost JD, Hermanson BK. Articular cartilage lesions of the knee. *Arthroscopy.* 1989 Jan;5(4):258–68.
7. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy.* 1997 Aug;13(4):456–60.
8. Hjellev K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy.* 2002 Sep;18(7):730–4.
9. Seed SM, Dunican KC, Lynch AM. Osteoarthritis: a review of treatment options. *Geriatrics.* 2009 Oct;64(10):20–9.
10. Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum.* 1998 Aug;41(8):1343–55.
11. Granan L-P, Forssblad M, Lind M, Engebretsen L. The Scandinavian ACL registries 2004-2007: baseline epidemiology. *Acta Orthop.* 2009 Oct;80(5):563–7.
12. Higuchi H, Shirakura K, Kimura M, Terauchi M, Shinozaki T, Watanabe H, et al. Changes in biochemical parameters after anterior cruciate ligament injury. *Int Orthop.* 2006 Feb;30(1):43–7.
13. Forriol F, Longo UG, Hernández-Vaquero D, Monllau JC, Montserrat F, Valentí JR, et al. The effects of previous meniscus and anterior cruciate ligament injuries in patients with total knee arthroplasty. *Ortop Traumatol Rehabil.* 2010 Jan;12(1):50–7.

14. McDevitt C, Gilbertson E, Muir H. An experimental model of osteoarthritis; early morphological and biochemical changes. *J Bone Joint Surg Br.* 1977 Feb;59(1):24–35.
15. Englund M, Haugen IK, Guermazi A, Roemer FW, Niu J, Neogi T, et al. Evidence that Meniscus Damage May Be a Component of Osteoarthritis: The Framingham Study. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015 Aug 26 [Epub ahead of print]
16. Fukubayashi T, Kurosawa H. The contact area and pressure distribution pattern of the knee. A study of normal and osteoarthrotic knee joints. *Acta Orthop Scand.* 1980 Dec;51(6):871–9.
17. Krause WR, Pope MH, Johnson RJ, Wilder DG. Mechanical changes in the knee after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am.* 1976 Jul;58(5):599–604.
18. Baratz ME, Fu FH, Mengato R. Meniscal tears: the effect of meniscectomy and of repair on intraarticular contact areas and stress in the human knee. A preliminary report. *Am J Sports Med.* 1986 Jan;14(4):270–5.
19. Voloshin AS, Wosk J. Shock absorption of meniscectomized and painful knees: a comparative in vivo study. *J Biomed Eng.* 1983 Apr;5(2):157–61.
20. Lanzer WL, Komenda G. Changes in articular cartilage after meniscectomy. *Clin Orthop Relat Res.* 1990 Mar;(252):41–8.
21. Barker SL, McNicholas MJ, Kader D, Abdon P, Adalberth T, McGurty D, et al. Meniscal regeneration in the long-term after total meniscectomy? *J R Coll Surg Edinb.* 1998 Dec;43(6):400–3.
22. Fairbank TJ. Knee joint changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Br.* 1948 Nov;30B(4):664–70.
23. Andersson-Molina H, Karlsson H, Rockborn P. Arthroscopic partial and total meniscectomy: A long-term follow-up study with matched controls. *Arthroscopy.* 2002 Feb;18(2):183–9. 3
24. Servien E, Acquitter Y, Hulet C, Seil R. Lateral meniscus lesions on stable knee: a prospective multicenter study. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2009 Dec;95(8 Suppl 1):S60–4.
25. Günther KP, Stürmer T, Sauerland S, Zeissig I, Sun Y, Kessler S, et al. Prevalence of generalised osteoarthritis in patients with advanced hip and knee osteoarthritis: the Ulm Osteoarthritis Study. *Ann Rheum Dis.* 1998 Dec;57(12):717–23.

26. Eyre DR, McDevitt CA, Billingham ME, Muir H. Biosynthesis of collagen and other matrix proteins by articular cartilage in experimental osteoarthritis. *Biochem J.* 1980 Jun 15;188(3):823–37.
27. Woo SL, Buckwalter JA. AAOS/NIH/ORS workshop. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Savannah, Georgia, June 18-20, 1987. *J Orthop Res.* 1988 Jan;6(6):907–31.
28. Treppo S, Koepp H, Quan EC, Cole AA, Kuettner KE, Grodzinsky AJ. Comparison of biomechanical and biochemical properties of cartilage from human knee and ankle pairs. *J Orthop Res.* 2000 Sep;18(5):739–48.
29. Muir IH. Biochemistry of articular cartilage in rheumatic diseases. *Scand J Rheumatol Suppl.* 1980 Jan;38:25–9.
30. Czitrom AA, Keating S, Gross AE. The viability of articular cartilage in fresh osteochondral allografts after clinical transplantation. *J Bone Joint Surg Am.* 1990 Apr;72(4):574–81.
31. Rosenberg TD, Scott SM, Coward DB, Dunbar WH, Ewing JW, Johnson CL, et al. Arthroscopic meniscal repair evaluated with repeat arthroscopy. *Arthroscopy.* 1986 Jan;2(1):14–20.
32. LeRoux MA, Arokoski J, Vail TP, Guilak F, Hyttinen MM, Kiviranta I, et al. Simultaneous changes in the mechanical properties, quantitative collagen organization, and proteoglycan concentration of articular cartilage following canine meniscectomy. *J Orthop Res.* 2000 May;18(3):383–92.
33. Lu XL, Mow VC. Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties. *Med Sci Sports Exerc.* 2008 Feb;40(2):193–9.
34. Tkaczuk H. Human cartilage stiffness. In vivo studies. *Clin Orthop Relat Res.* 1986 May;(206):301–12.
35. Armstrong CG, Bahrani AS, Gardner DL. In vitro measurement of articular cartilage deformations in the intact human hip joint under load. *J Bone Joint Surg Am.* 1979 Jul;61(5):744–55.
36. Ding M, Dalstra M, Linde F, Hvid I. Changes in the stiffness of the human tibial cartilage-bone complex in early-stage osteoarthritis. *Acta Orthop Scand.* 1998 Aug;69(4):358–62.
37. Herzog W, Diet S, Suter E, Mayzus P, Leonard TR, Müller C, et al. Material and functional properties of articular cartilage and patellofemoral contact mechanics in an experimental model of osteoarthritis. *J Biomech.* 1998 Dec;31(12):1137–45.

38. Salter RB, Simmonds DF, Malcolm BW, Rumble EJ, MacMichael D, Clements ND. The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am*. 1980 Dec;62(8):1232–51.
39. Gray ML, Pizzanelli AM, Grodzinsky AJ, Lee RC. Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J Orthop Res*. 1988 Jan;6(6):777–92.
40. Woo SL, Debski RE, Withrow JD, Janaushek MA. Biomechanics of knee ligaments. *Am J Sports Med*. 1999 Jul-Aug;27(4):533–43.
41. Hall AC, Urban JP, Gehl KA. The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage. *J Orthop Res*. 1991 Jan;9(1):1–10.
42. Parkkinen JJ, Lammi MJ, Pelttari A, Helminen HJ, Tammi M, Virtanen I. Altered Golgi apparatus in hydrostatically loaded articular cartilage chondrocytes. *Ann Rheum Dis*. 1993 Mar;52(3):192–8.
43. Little CB, Ghosh P, Rose R. The effect of strenuous versus moderate exercise on the metabolism of proteoglycans in articular cartilage from different weight-bearing regions of the equine third carpal bone. *Osteoarthritis Cartilage*. 1997 May;5(3):161–72.
44. Little CB, Flannery CR, Hughes CE, Goodship A, Caterson B. Cytokine induced metalloproteinase expression and activity does not correlate with focal susceptibility of articular cartilage to degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 Feb;13(2):162–70.
45. Martin JA, Ellerbroek SM, Buckwalter JA. Age-related decline in chondrocyte response to insulin-like growth factor-I: the role of growth factor binding proteins. *J Orthop Res*. 1997 Jul;15(4):491–8.
46. Laasanen MS, Töyräs J, Korhonen RK, Rieppo J, Saarakkala S, Nieminen MT, et al. Biomechanical properties of knee articular cartilage. *Biorheology*. 2003 Jan;40(1-3):133–40.
47. Walker GD, Fischer M, Gannon J, Thompson RC, Oegema TR. Expression of type-X collagen in osteoarthritis. *J Orthop Res*. 1995 Jan;13(1):4–12.
48. Alcaraz MJ, Megías J, García-Arnandis I, Clérigues V, Guillén MI. New molecular targets for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol*. 2010 Jul 1;80(1):13–21.
49. Altman RD, Moskowitz R. Intraarticular sodium hyaluronate (Hyalgan) in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial. Hyalgan Study Group. *J Rheumatol*. 1998 Nov;25(11):2203–12.

50. Martinek V, Ueblacker P, Imhoff AB. Current concepts of gene therapy and cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br.* 2003 Aug;85(6):782–8.
51. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 1986 Aug;29(8):1039–49.
52. Messner K, Maletius W. The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop Scand.* 1996 Apr;67(2):165–8.
53. Tyler JA. Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem J.* 1989 Jun 1;260(2):543–8.
54. Dean DD, Muniz OE, Berman I, Pita JC, Carreno MR, Woessner JF, et al. Localization of collagenase in the growth plate of rachitic rats. *J Clin Invest.* 1985 Aug;76(2):716–22.
55. Sah RL, Trippel SB, Grodzinsky AJ. Differential effects of serum, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor-2 on the maintenance of cartilage physical properties during long-term culture. *J Orthop Res.* 1996 Jan;14(1):44–52.
56. Yamamoto H, Sohmiya M, Oka N, Kato Y. Effects of aging and sex on plasma insulin-like growth factor I (IGF-I) levels in normal adults. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1991 May;124(5):497–500.
57. Schouten JS, Van den Ouweland FA, Valkenburg HA, Lamberts SW. Insulin-like growth factor-1: a prognostic factor of knee osteoarthritis. *Br J Rheumatol.* 1993 Apr;32(4):274–80.
58. Fraenkel L, Zhang Y, Trippel SB, McAlindon TE, LaValley MP, Assif A, et al. Longitudinal analysis of the relationship between serum insulin-like growth factor-I and radiographic knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 1998 Sep;6(5):362–7.
59. Acosta CA, Izal I, Ripalda P, Douglas-Price AL, Forriol F. Gene expression and proliferation analysis in young, aged, and osteoarthritic sheep chondrocytes effect of growth factor treatment. *J Orthop Res.* 2006 Nov;24(11):2087–94.
60. Lafeber FP, van Roy HL, van der Kraan PM, van den Berg WB, Bijlsma JW. Transforming growth factor-beta predominantly stimulates



phenotypically changed chondrocytes in osteoarthritic human cartilage. *J Rheumatol.* 1997 Mar;24(3):536–42.

61. Wei X, Messner K. Age- and injury-dependent concentrations of transforming growth factor-beta 1 and proteoglycan fragments in rabbit knee joint fluid. *Osteoarthritis Cartilage.* 1998 Jan;6(1):10–8.
62. Westacott CI, Sharif M. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin Arthritis Rheum.* 1996 Feb;25(4):254–72.
63. Trippel SB. Growth factor inhibition: potential role in the etiopathogenesis of osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res.* 2004 Oct;427(Suppl):S47–52.
64. Middleton J, Manthey A, Tyler J. Insulin-like growth factor (IGF) receptor, IGF-I, interleukin-1 beta (IL-1 beta), and IL-6 mRNA expression in osteoarthritic and normal human cartilage. *J Histochem Cytochem.* 1996 Feb;44(2):133–41.
65. Irie K, Uchiyama E, Iwaso H. Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. *Knee.* 2003 Mar;10(1):93–6.
66. Bunning RA, Russell RG. The effect of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon on the resorption of human articular cartilage and on the production of prostaglandin E and of caseinase activity by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 1989 Jun;32(6):780–4.
67. Kahle P, Saal JG, Schaudt K, Zacher J, Fritz P, Pawelec G. Determination of cytokines in synovial fluids: correlation with diagnosis and histomorphological characteristics of synovial tissue. *Ann Rheum Dis.* 1992 Jun;51(6):731–4.
68. Wilusz RE, Weinberg JB, Guilak F, McNulty AL. Inhibition of integrative repair of the meniscus following acute exposure to interleukin-1 in vitro. *J Orthop Res.* 2008 Apr;26(4):504–12.
69. Guerne PA, Carson DA, Lotz M. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. *J Immunol.* 1990 Jan 15;144(2):499–505.
70. Mitchell PG, Cheung HS. Tumor necrosis factor alpha and epidermal growth factor regulation of collagenase and stromelysin in adult porcine articular chondrocytes. *J Cell Physiol.* 1991 Oct;149(1):132–40.
71. Campbell IK, Piccoli DS, Roberts MJ, Muirden KD, Hamilton JA. Effects of tumor necrosis factor alpha and beta on resorption of human articular cartilage and production of plasminogen activator by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 1990 Apr;33(4):542–52.

72. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum.* 2001 Jun;44(6):1237–47.
73. Van der Kraan PM, Buma P, van Kuppevelt T, van den Berg WB. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002 Aug;10(8):631–7.
74. Attur MG, Dave MN, Clancy RM, Patel IR, Abramson SB, Amin AR. Functional genomic analysis in arthritis-affected cartilage: yin-yang regulation of inflammatory mediators by alpha 5 beta 1 and alpha V beta 3 integrins. *J Immunol.* 2000 Mar 1;164(5):2684–91.
75. Dingle JT, Saklatvala J, Hembry R, Tyler J, Fell HB, Jubb R. A cartilage catabolic factor from synovium. *Biochem J.* 1979 Oct;184(1):177–80.
76. Fell HB, Jubb RW. The effect of synovial tissue on the breakdown of articular cartilage in organ culture. *Arthritis Rheum.* 1977 Jan;20(7):1359–71.
77. Freemont AJ, Hampson V, Tilman R, Goupille P, Taiwo Y, Hoyland JA. Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Ann Rheum Dis.* 1997 Sep;56(9):542–9.
78. Chen AL, Fang C, Liu C, Leslie MP, Chang E, Di Cesare PE. Expression of bone morphogenetic proteins, receptors, and tissue inhibitors in human fetal, adult, and osteoarthritic articular cartilage. *J Orthop Res.* 2004 Nov;22(6):1188–92.
79. Trippel SB. Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl.* 1995 Feb;43:129–32.
80. Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I, et al. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1998 Dec;41(12):2165–74.
81. Moos V, Fickert S, Müller B, Weber U, Sieper J. Immunohistological analysis of cytokine expression in human osteoarthritic and healthy cartilage. *J Rheumatol.* 1999 Apr;26(4):870–9.
82. Towle CA, Hung HH, Bonassar LJ, Treadwell B V, Mangham DC. Detection of interleukin-1 in the cartilage of patients with osteoarthritis: a possible autocrine/paracrine role in pathogenesis. *Osteoarthritis Cartilage.* 1997 Sep;5(5):293–300.

83. Curtis CL, Rees SG, Little CB, Flannery CR, Hughes CE, Wilson C, et al. Pathologic indicators of degradation and inflammation in human osteoarthritic cartilage are abrogated by exposure to n-3 fatty acids. *Arthritis Rheum.* 2002 Jun;46(6):1544–53.
84. Martel-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J, Faure MP, Chin JA, Fournier S, et al. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum.* 1992 May;35(5):530–40.
85. Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum.* 2001 Mar;44(3):585–94.
86. Trippel SB. Growth factors as therapeutic agents. *Instr Course Lect.* 1997 Jan;46:473–6.
87. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. The potential of signal transduction inhibitors for the treatment of arthritis: Is it all just JNK? *J Clin Invest.* 2001 Jul;108(2):181–3.
88. Shlopov B V, Lie WR, Mainardi CL, Cole AA, Chubinskaya S, Hasty KA. Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum.* 1997 Nov;40(11):2065–74.
89. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991 May;5(8):2145–54.
90. Woessner JF, Gunja-Smith Z. Role of metalloproteinases in human osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl.* 1991 Feb;27:99–101.
91. Mow VC, Wang CC. Some bioengineering considerations for tissue engineering of articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Oct;367(Suppl):S204–23.
92. Van den Berg WB. Anti-cytokine therapy in chronic destructive arthritis. *Arthritis Res.* 2001 Jan;3(1):18–26.
93. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell.* 1996 May 3;85(3):307–10.
94. Augustyniak E, Trzeciak T, Richter M, Kaczmarczyk J, Suchorska W. The role of growth factors in stem cell-directed chondrogenesis: a real hope for damaged cartilage regeneration. *Int Orthop.* 2015 May;39(5):995–1003.

95. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970 Oct;3(4):393–403.
96. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res.* 1980 Sep;(151):294–307.
97. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp.* 1988 Jan;136:42–60.
98. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991 Sep;9(5):641–50.
99. Gratama J, Kvalheim G, Orfao A. Standardization of cell analysis methods in clinical cellular therapy programs: A challenge for ISCT. *Cytotherapy.* 2006 Jan;8(6):528–9.
100. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* 1998 Jan;4(4):415–28.
101. Sánchez-Abarca LI, Álvarez-Laderas I, Díez Campelo M, Caballero-Velázquez T, Herrero C, Muntión S, et al. Uptake and delivery of antigens by mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2013 Jun;15(6):673–8.
102. Ji YR, Yang ZX, Han Z-B, Meng L, Liang L, Feng XM, et al. Mesenchymal stem cells support proliferation and terminal differentiation of B cells. *Cell Physiol Biochem.* 2012 Jan;30(6):1526–37.
103. Von Lüttichau I, Notohamiprodjo M, Wechselberger A, Peters C, Henger A, Seliger C, et al. Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells Dev.* 2005 Jun;14(3):329–36.
104. Stenderup K, Justesen J, Eriksen EF, Rattan SI, Kassem M. Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2001 Jun;16(6):1120–9.
105. Narbona-Carceles J, Vaquero J, Suárez-Sancho SBS, Forriol F, Fernández-Santos ME. Bone marrow mesenchymal stem cell aspirates from alternative sources: is the knee as good as the iliac crest? *Injury.* 2014 Oct;45 Suppl 4:S42–7.
106. Grässel S, Stöckl S, Jenei-Lanzl Z. Somatic Stem Cells. Singh SR, editor. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). Totowa, NJ: Humana Press; 2012. 203-67 p.

107. Rustad KC, Gurtner GC. Mesenchymal Stem Cells Home to Sites of Injury and Inflammation. *Adv wound care*. 2012 Aug;1(4):147–52.
108. Boregowda S V, Phinney DG. Therapeutic applications of mesenchymal stem cells: current outlook. *BioDrugs*. 2012 Aug 1;26(4):201–8.
109. Hoffa A. [The first treatment for bone fractures and dislocations. From the series on “First Medical Treatment” occasioned by the Central Committee for Medical Education in Prussia (Winter Semester 1904-05)]. *Z Arztl Fortbild Qualitatssich*. 2001 Apr;95(3):229–30.
110. Gallagher J, Tierney P, Murray P, O'Brien M. The infrapatellar fat pad: anatomy and clinical correlations. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2005 May;13(4):268–72.
111. Bisicchia S, Savarese E. Infra-patellar fat pad cysts: a case report and review of the literature. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2012;2(4):305–8.
112. O'Donoghue DH. A method for replacement of the anterior cruciate ligament of the knee. *J Bone Joint Surg Am*. 1963 Jul;45:905–24.
113. Arnoczky SP, Tarvin GB, Marshall JL. Anterior cruciate ligament replacement using patellar tendon. An evaluation of graft revascularization in the dog. *J Bone Joint Surg Am*. 1982 Feb;64(2):217–24.
114. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1957 Dec;16(4):494–502.
115. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55–63.
116. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun*. 1991 Jul;3(7):207–12.
117. Alonso V, de Gortázar AR, Ardura JA, Andrade-Zapata I, Alvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Cell Physiol*. 2008 Dec;217(3):717–27.
118. Ryd L, Brittberg M, Eriksson K, Jurvelin JS, Lindahl A, Marlovits S, et al. Pre-Osteoarthritis: Definition and Diagnosis of an Elusive Clinical Entity. *Cartilage*. 2015 Jul;6(3):156–65.
119. Scotece M, Mobasheri A. Leptin in osteoarthritis: Focus on articular cartilage and chondrocytes. *Life Sci*. 2015 Jun 19;[Epub ahead of print].

120. Luyten FP, Denti M, Filardo G, Kon E, Engebretsen L. Definition and classification of early osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012 Mar;20(3):401–6.
121. Chu CR, Andriacchi TP. Dance between biology, mechanics, and structure: A systems-based approach to developing osteoarthritis prevention strategies. *J Orthop Res.* 2015 Jul;33(7):939–47.
122. Dye SF. The knee as a biologic transmission with an envelope of function: a theory. *Clin Orthop Relat Res.* 1996 Apr;(325):10–8.
123. Radin EL, Paul IL, Rose RM. Current concepts of the etiology of idiopathic osteoarthrosis. *Bull Hosp Joint Dis.* 1977 Oct;38(2):117–20.
124. De Paula FJA, Rosen CJ. Back to the future: revisiting parathyroid hormone and calcitonin control of bone remodeling. *Horm Metab Res.* 2010 May;42(5):299–306.
125. Karsdal MA, Bay-Jensen AC, Lories RJ, Abramson S, Spector T, Pastoureau P, et al. The coupling of bone and cartilage turnover in osteoarthritis: opportunities for bone antiresorptives and anabolics as potential treatments? *Ann Rheum Dis.* 2014 Feb;73(2):336–48.
126. Bonjour J-P. Nutritional disturbance in acid-base balance and osteoporosis: a hypothesis that disregards the essential homeostatic role of the kidney. *Br J Nutr.* 2013 Oct;110(7):1168–77.
127. Yusuf E, Nelissen RG, Ioan-Facsinay A, Stojanovic-Susulic V, DeGroot J, van Osch G, et al. Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review. *Ann Rheum Dis.* 2010 Apr;69(4):761–5.
128. Pottie P, Presle N, Terlain B, Netter P, Mainard D, Berenbaum F. Obesity and osteoarthritis: more complex than predicted! *Ann Rheum Dis.* 2006 Nov;65(11):1403–5.
129. Poole AR. Osteoarthritis as a whole joint disease. *HSS J.* 2012 Feb;8(1):4–6.
130. Clockaerts S, Bastiaansen-Jenniskens YM, Runhaar J, Van Osch GJVM, Van Offel JF, Verhaar J a N, et al. The infrapatellar fat pad should be considered as an active osteoarthritic joint tissue: A narrative review. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18(7):876–82.
131. Ushiyama T, Chano T, Inoue K, Matsusue Y. Cytokine production in the infrapatellar fat pad: another source of cytokines in knee synovial fluids. *Ann Rheum Dis.* 2003 Feb;62(2):108–12.

132. Conde J, Scotece M, López V, Abella V, Hermida M, Pino J, et al. Differential expression of adipokines in infrapatellar fat pad (IPFP) and synovium of osteoarthritis patients and healthy individuals. *Ann Rheum Dis*. 2014 Mar;73(3):631–3.
133. Eymard F, Pigenet A, Citadelle D, Flouzat-Lachaniette C-H, Poignard A, Benelli C, et al. Induction of an inflammatory and prodegradative phenotype in autologous fibroblast-like synoviocytes by the infrapatellar fat pad from patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014 Aug;66(8):2165–74.
134. Ioan-Facsinay A, Kloppenburg M. An emerging player in knee osteoarthritis: the infrapatellar fat pad. *Arthritis Res Ther*. 2013 Jan;15(6):225.
135. Wang C-Y, Tsai P-H, Siow TY, Lee H-S, Chang Y-C, Hsu Y-C, et al. Change in T2\* relaxation time of Hoffa fat pad correlates with histologic change in a rat anterior cruciate ligament transection model. *J Orthop Res*. 2015 Sep;33(9):1348–55.
136. Gierman LM, Wopereis S, van El B, Verheij ER, Werff-van der Vat BJC, Bastiaansen-Jenniskens YM, et al. Metabolic profiling reveals differences in concentrations of oxylipins and fatty acids secreted by the infrapatellar fat pad of donors with end-stage osteoarthritis and normal donors. *Arthritis Rheumatol*. 2013 Oct;65(10):2606–14.
137. Poonpet T, Honsawek S. Adipokines: Biomarkers for osteoarthritis? *World J Orthop*. 2014 Jul 18;5(3):319–27.
138. Cai J, Xu J, Wang K, Zheng S, He F, Huan S, et al. Association Between Infrapatellar Fat Pad Volume and Knee Structural Changes in Patients with Knee Osteoarthritis. *J Rheumatol*. 2015 Aug 15;[Epub ahead of print].
139. Pan F, Han W, Wang X, Liu Z, Jin X, Antony B, et al. A longitudinal study of the association between infrapatellar fat pad maximal area and changes in knee symptoms and structure in older adults. *Ann Rheum Dis*. 2015 Oct;74(10):1818–24.
140. Lafeber FPJG, van Spil WE. Osteoarthritis year 2013 in review: biomarkers; reflecting before moving forward, one step at a time. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013 Oct;21(10):1452–64.
141. Mickiewicz B, Heard BJ, Chau JK, Chung M, Hart DA, Shrive NG, et al. Metabolic profiling of synovial fluid in a unilateral ovine model of anterior cruciate ligament reconstruction of the knee suggests biomarkers for early osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2015 Jan;33(1):71–7.

142. Mine T, Kimura M, Sakka A, Kawai S. Innervation of nociceptors in the menisci of the knee joint: an immunohistochemical study. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2000 Jan;120(3-4):201–4.
143. Brenn D, Richter F, Schaible H-G. Sensitization of unmyelinated sensory fibers of the joint nerve to mechanical stimuli by interleukin-6 in the rat: an inflammatory mechanism of joint pain. *Arthritis Rheum.* 2007 Jan;56(1):351–9.
144. Cuellar JM, Scuderi GJ, Cuellar VG, Golish SR, Yeomans DC. Diagnostic utility of cytokine biomarkers in the evaluation of acute knee pain. *J Bone Joint Surg Am.* 2009 Oct;91(10):2313–20.
145. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997 Apr 18;89(2):309–19.
146. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Apr 1;22(4):549–53.
147. Krakauer T. Nuclear factor-kappaB: fine-tuning a central integrator of diverse biologic stimuli. *Int Rev Immunol.* 2008 Jan;27(5):286–92.
148. Bargman R, Posham R, Boskey A, Carter E, DiCarlo E, Verdelis K, et al. High- and low-dose OPG-Fc cause osteopetrosis-like changes in infant mice. *Pediatr Res.* 2012 Nov;72(5):495–501.
149. Lloyd SA, Morony SE, Ferguson VL, Simske SJ, Stodieck LS, Warmington KS, et al. Osteoprotegerin is an effective countermeasure for spaceflight-induced bone loss in mice. *Bone.* 2015 Aug 27;[Epub ahead of print].
150. Ramos YFM, Bos SD, van der Breggen R, Kloppenburg M, Ye K, Lameijer E-WEMW, et al. A gain of function mutation in TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes osteoarthritis with chondrocalcinosis. *Ann Rheum Dis.* 2015 Sep;74(9):1756–62.
151. Tat SK, Pelletier JP, Velasco CR, Padrines M, Martel-Pelletier J. New perspective in osteoarthritis: The OPG and RANKL system as a potential therapeutic target? *Keio J Med.* 2009;58(1):29–40.
152. Mannstadt M, Jüppner H, Gardella TJ. Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol.* 1999 Nov;277(5 Pt 2):F665–75.



153. Cowan RW, Singh G, Ghert M. PTHrP increases RANKL expression by stromal cells from giant cell tumor of bone. *J Orthop Res*. 2012 Jun;30(6):877–84.
154. Offermanns S, Iida-Klein A, Segre G V, Simon MI. G alpha q family members couple parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide and calcitonin receptors to phospholipase C in COS-7 cells. *Mol Endocrinol*. 1996 May;10(5):566–74.
155. Yamaguchi T, Hosomichi K, Narita A, Shiota T, Tomoyasu Y, Maki K, et al. Exome resequencing combined with linkage analysis identifies novel PTH1R variants in primary failure of tooth eruption in Japanese. *J Bone Miner Res*. 2011 Jul;26(7):1655–61.
156. Becher C, Szuwart T, Ronstedt P, Ostermeier S, Skwara A, Fuchs-Winkelmann S, et al. Decrease in the expression of the type 1 PTH/PTHrP receptor (PTH1R) on chondrocytes in animals with osteoarthritis. *J Orthop Surg Res*. 2010 Jan;5:28.
157. Yan J, Tian F, Wang W-Y, Cheng Y, Song H-P, Zhang Y-Z, et al. Parathyroid hormone (1-34) prevents cartilage degradation and preserves subchondral bone micro-architecture in guinea pigs with spontaneous osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014 Nov;22(11):1869–77.
158. Mueller MB, Fischer M, Zellner J, Berner A, Dienstknecht T, Kujat R, et al. Effect of parathyroid hormone-related protein in an in vitro hypertrophy model for mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Int Orthop*. 2013;37(5):945–51.
159. Chung U II, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest*. 2001;107(3):295–304.
160. Kim HS. Assignment1 of the human basic fibroblast growth factor gene FGF2 to chromosome 4 band q26 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet*. 1998 Jan;83(1-2):73.
161. Orpana A, Salven P. Angiogenic and lymphangiogenic molecules in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2002 Feb;43(2):219–24.
162. Kühn MC, Willenberg HS, Schott M, Papewalis C, Stumpf U, Flohé S, et al. Adipocyte-secreted factors increase osteoblast proliferation and the OPG/RANKL ratio to influence osteoclast formation. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Feb 26;349(2):180–8.
163. House SL, Bolte C, Zhou M, Doetschman T, Klevitsky R, Newman G, et al. Cardiac-specific overexpression of fibroblast growth factor-2 protects against myocardial dysfunction and infarction in a murine model of low-flow ischemia. *Circulation*. 2003 Dec 23;108(25):3140–8.

164. Pereira RC, Economides AN, Canalis E. Bone morphogenetic proteins induce gremlin, a protein that limits their activity in osteoblasts. *Endocrinology*. 2000 Dec;141(12):4558–63.
165. Lee SY, Nakagawa T, Reddi a. H. Induction of chondrogenesis and expression of superficial zone protein (SZP)/lubricin by mesenchymal progenitors in the infrapatellar fat pad of the knee joint treated with TGF- $\beta$ 1 and BMP-7. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;376(1):148–53.
166. Khan WS, Tew SR, Adesida AB, Hardingham TE. Human infrapatellar fat pad-derived stem cells express the pericyte marker 3G5 and show enhanced chondrogenesis after expansion in fibroblast growth factor-2. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(4):R74.
167. Buckley CT, Kelly DJ. Expansion in the presence of FGF-2 enhances the functional development of cartilaginous tissues engineered using infrapatellar fat pad derived MSCs. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012 Jul;11:102–11.
168. Chia S-L, Sawaji Y, Burleigh A, McLean C, Inglis J, Saklatvala J, et al. Fibroblast growth factor 2 is an intrinsic chondroprotective agent that suppresses ADAMTS-5 and delays cartilage degradation in murine osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2009 Jul;60(7):2019–27.
169. Gavrilovic J. Fibroblast growth factor 2: A new key player in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2009 Jul;60(7):1869–72.
170. Khalil N. TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect*. 1999 Dec;1(15):1255–63.
171. Borchering N, Kusner D, Kolb R, Xie Q, Li W, Yuan F, et al. Paracrine WNT5A Signaling Inhibits Expansion of Tumor-Initiating Cells. *Cancer Res*. 2015 May 15;75(10):1972–82.
172. Goto H, Shuler FD, Niyibizi C, Fu FH, Robbins PD, Evans CH. Gene therapy for meniscal injury: enhanced synthesis of proteoglycan and collagen by meniscal cells transduced with a TGFbeta(1)gene. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000 Jul;8(4):266–71.
173. Goomer RS, Maris TM, Gelberman R, Boyer M, Silva M, Amiel D. Nonviral in vivo gene therapy for tissue engineering of articular cartilage and tendon repair. *Clin Orthop Relat Res*. 2000 Oct;(379 Suppl):S189–200.
174. Ye K, Felimban R, Traianedes K, Moulton SE, Wallace GG, Chung J, et al. Chondrogenesis of infrapatellar fat pad derived adipose stem cells in 3D printed chitosan scaffold. *PLoS One*. 2014 Jun 11;9(6):e99410.

175. Su S-L, Yang H-Y, Lee H-S, Huang G-S, Lee C-H, Liu W-S, et al. Gene-gene interactions between TGF- $\beta$ /Smad3 signalling pathway polymorphisms affect susceptibility to knee osteoarthritis. *BMJ Open*. 2015;5(6):e007931.
176. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet*. 1990 Apr;6(4):121–5.
177. Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem*. 1996 May 31;271(22):13055–60.
178. Uchida K, Satoh M, Inoue G, Onuma K, Miyagi M, Iwabuchi K, et al. CD11c(+) macrophages and levels of TNF- $\alpha$  and MMP-3 are increased in synovial and adipose tissues of osteoarthritic mice with hyperlipidaemia. *Clin Exp Immunol*. 2015 Jun;180(3):551–9.
179. Freije JM, Díez-Itza I, Balbín M, Sánchez LM, Blasco R, Tolivia J, et al. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem*. 1994 Jun 17;269(24):16766–73.
180. Johansson N, Ahonen M, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci*. 2000 Jan 20;57(1):5–15.
181. Liu Z, Cai H, Zheng X, Zhang B, Xia C. The Involvement of Mutual Inhibition of ERK and mTOR in PLC $\gamma$ 1-Mediated MMP-13 Expression in Human Osteoarthritis Chondrocytes. *Int J Mol Sci*. 2015 Jan;16(8):17857–69.
182. Weiler C, Nerlich A, Zipperer J, Bachmeier B, Boos N. 2002 SSE award competition in basic science: Expression of major matrix metalloproteinases is associated with intervertebral disc degradation and resorption. *Eur Spine J*. 2002;11(4):308–20.
183. Haller JM, Swearingen CA, Partridge D, McFadden M, Thirunavukkarasu K, Higgins TF. Intraarticular Matrix Metalloproteinases and Aggrecan Degradation Are Elevated After Articular Fracture. *Clin Orthop Relat Res*. 2015 Oct;473(10):3280–8.
184. Fosang AJ, Last K, Maciewicz RA. Aggrecan is degraded by matrix metalloproteinases in human arthritis. Evidence that matrix metalloproteinase and aggrecanase activities can be independent. *J Clin Invest*. 1996 Nov 15;98(10):2292–9.
185. Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hachem K, et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater*. 2011 Jan;21:202–20.

186. Francioli S, Cavallo C, Grigolo B, Martin I, Barbero A. Engineered cartilage maturation regulates cytokine production and interleukin-1 $\beta$  response. *Clin Orthop Relat Res*. 2011 Oct;469(10):2773–84.
187. Struglics A, Larsson S, Pratta MA, Kumar S, Lark MW, Lohmander LS. Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 Feb;14(2):101–13.
188. Tchetverikov I, Lohmander LS, Verzijl N, Huizinga TWJ, TeKoppele JM, Hanemaaijer R, et al. MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005 May;64(5):694–8.
189. Caplan AI, Correa D. PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSCs. *J Orthop Res*. 2011 Dec;29(12):1795–803.
190. Matsukura Y, Muneta T, Tsuji K, Koga H, Sekiya I. Mesenchymal stem cells in synovial fluid increase after meniscus injury. *Clin Orthop Relat Res*. 2014;472(5):1357–64.
191. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007 Nov;213(2):341–7.
192. Scotti C. CORR Insights®: Mesenchymal stem cells in synovial fluid increase after meniscus injury. *Clin Orthop Relat Res*. 2014 May;472(5):1365–6.
193. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Cui J-G, Prockop DJ. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J Bone Miner Res*. 2004 Feb;19(2):256–64.
194. Hatsushika D, Muneta T, Horie M, Koga H, Tsuji K, Sekiya I. Intraarticular injection of synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit massive meniscal defect model. *J Orthop Res*. 2013 Sep;31(9):1354–9.
195. Horie M, Choi H, Lee RH, Reger RL, Ylostalo J, Muneta T, et al. Intra-articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012 Oct;20(10):1197–207.
196. Sekiya I, Ojima M, Suzuki S, Yamaga M, Horie M, Koga H, et al. Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2012 Jun;30(6):943–9.

197. Horie M, Driscoll MD, Sampson HW, Sekiya I, Caroom CT, Prockop DJ, et al. Implantation of allogenic synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit meniscal defect model. *J Bone Joint Surg Am*. 2012 Apr 18;94(8):701–12.
198. Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, et al. Intra-articular Injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. *Stem Cells*. 2009 Apr;27(4):878–87.
199. De Bari C, Dell'accio F. Mesenchymal stem cells in rheumatology: a regenerative approach to joint repair. *Clin Sci (Lond)*. 2007 Oct;113(8):339–48.
200. Fox DB, Warnock JJ. Cell-based meniscal tissue engineering: a case for synoviocytes. *Clin Orthop Relat Res*. 2011 Oct;469(10):2806–16.
201. Morito T, Muneta T, Hara K, Ju Y-J, Mochizuki T, Makino H, et al. Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Aug;47(8):1137–43.
202. Vinardell T, Buckley CT, Thorpe SD, Kelly DJ. Composition-function relations of cartilaginous tissues engineered from chondrocytes and mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and infrapatellar fat pad. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 Oct;5(9):673–83.
203. Martínez de Albornoz Torrente P, Forriol F. [Changes in synovial fluid in different knee-joint diseases]. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2012 Jan;56(2):140–8.
204. Arnoczky SP, Warren RF. The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog. *Am J Sports Med*. 1983 Jan;11(3):131–41.
205. Fisher MB, Belkin NS, Milby AH, Henning EA, Bostrom M, Kim M, et al. Cartilage repair and subchondral bone remodeling in response to focal lesions in a mini-pig model: implications for tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2015 Feb;21(3-4):850–60. t
206. Zhang Z, Zhong X, Ji H, Tang Z, Bai J, Yao M, et al. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation for the treatment of chondral defects of the knees in Chinese patients. *Drug Des Devel Ther*. 2014 Jan;8:2439–48.
207. Segawa Y, Muneta T, Makino H, Nimura A, Mochizuki T, Ju Y-J, et al. Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profiles. *J Orthop Res*. 2009 Apr;27(4):435–41.

208. Cisa J, Basora J, Madarnas P, Ghibely A, Navarro-Quilis A. Meniscal repair by synovial flap transfer. Healing of the avascular zone in rabbits. *Acta Orthop Scand*. 1995 Feb;66(1):38–40.
209. Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 2003 Jul;(412):196–212.
210. Khan WS, Adesida AB, Tew SR, Longo UG, Hardingham TE. Fat pad-derived mesenchymal stem cells as a potential source for cell-based adipose tissue repair strategies. *Cell Prolif*. 2012 Apr;45(2):111–20.
211. Lopa S, Colombini A, Stanco D, de Girolamo L, Sansone V, Moretti M. Donor-matched mesenchymal stem cells from knee infrapatellar and subcutaneous adipose tissue of osteoarthritic donors display differential chondrogenic and osteogenic commitment. *Eur Cell Mater*. 2014 Jan;27:298–311.
212. Vinardell T, Sheehy EJ, Buckley CT, Kelly DJ. A comparison of the functionality and in vivo phenotypic stability of cartilaginous tissues engineered from different stem cell sources. *Tissue Eng Part A*. 2012 Jun;18(11-12):1161–70.
213. Meneghini RM, Pierson JL, Bagsby D, Berend ME, Ritter MA, Meding JB. The effect of retropatellar fat pad excision on patellar tendon contracture and functional outcomes after total knee arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2007 Sep;22(6 Suppl 2):47–50.
214. Ogilvie-Harris DJ, Giddens J. Hoffa's disease: arthroscopic resection of the infrapatellar fat pad. *Arthroscopy*. 1994 Apr;10(2):184–7.
215. Liu Y, Buckley CT, Downey R, Mulhall KJ, Kelly DJ. The role of environmental factors in regulating the development of cartilaginous grafts engineered using osteoarthritic human infrapatellar fat pad-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2012 Aug;18(15-16):1531–41.
216. Maroudas A, Bullough P, Swanson SA, Freeman MA. The permeability of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br*. 1968 Feb;50(1):166–77.
217. Kim KM, Kim JM, Yoo YH, Kim J II, Park YC. Cilostazol induces cellular senescence and confers resistance to etoposide-induced apoptosis in articular chondrocytes. *Int J Mol Med*. 2012;29(4):619–24.
218. Webb GR, Westacott CI, Elson CJ. Osteoarthritic synovial fluid and synovium supernatants up-regulate tumor necrosis factor receptors on human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998 May;6(3):167–76.

219. Hogan M V, Walker GN, Cui LR, Fu FH, Huard J. The role of stem cells and tissue engineering in orthopaedic sports medicine: current evidence and future directions. *Arthroscopy*. 2015 May;31(5):1017–21.
220. Perdisa F, Gostyńska N, Roffi A, Filardo G, Marcacci M, Kon E. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Articular Cartilage: A Systematic Review on Preclinical and Clinical Evidence. *Stem Cells Int*. 2015 Jan;2015:597652.
221. Hatsushika D, Muneta T, Nakamura T, Horie M, Koga H, Nakagawa Y, et al. Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014 Jul;22(7):941–50.
222. Huang T-F, Yew T-L, Chiang E-R, Ma H-L, Hsu C-Y, Hsu S-H, et al. Mesenchymal stem cells from a hypoxic culture improve and engraft Achilles tendon repair. *Am J Sports Med*. 2013 May;41(5):1117–25.
223. Filardo G, Madry H, Jelic M, Roffi A, Cucchiari M, Kon E. Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013 Aug;21(8):1717–29.
224. Koh Y-G, Choi Y-J. Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. *Knee*. 2012 Dec;19(6):902–7.
225. Moreno A, Martínez A, Olmedillas S, Bello S, de Miguel F. [Hyaluronic acid effect on adipose-derived stem cells. Biological in vitro evaluation]. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2015 Jan;59(4):215–21.
226. Campbell KA, Erickson BJ, Saltzman BM, Mascarenhas R, Bach BR, Cole BJ, et al. Is Local Viscosupplementation Injection Clinically Superior to Other Therapies in the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review of Overlapping Meta-analyses. *Arthroscopy*. 2015 May 18;[Epub ahead of print].
227. Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M, Karli D. Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain Physician*. 2008 Jan;11(3):343–53.
228. Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC, et al. Intra-Articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Proof-of-Concept Clinical Trial. *Stem Cells*. 2014 May 17;32(5):1254–66.
229. Hopper N, Henson F, Brooks R, Ali E, Rushton N, Wardale J. Peripheral blood derived mononuclear cells enhance osteoarthritic human chondrocyte migration. *Arthritis Res Ther*. 2015 Jan;17:199.

230. Pi Y, Zhang X, Shao Z, Zhao F, Hu X, Ao Y. Intra-articular delivery of anti-Hif-2 $\alpha$  siRNA by chondrocyte-homing nanoparticles to prevent cartilage degeneration in arthritic mice. *Gene Ther.* 2015 Jun;22(6):439–48.
231. Olson SA, Furman BD, Kraus VB, Huebner JL, Guilak F. Therapeutic opportunities to prevent post-traumatic arthritis: Lessons from the natural history of arthritis after articular fracture. *J Orthop Res.* 2015 Sep;33(9):1266–77.
232. Rodriguez-Fontenla C, Gonzalez A. Genetics of osteoarthritis. *Reumatol Clin.* Jan;11(1):33–40.





# ANEXOS

---

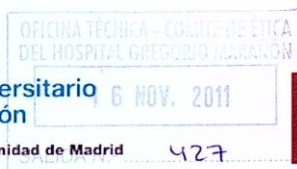


## ANEXO I: ACEPTACIÓN CEIC HGUGM



Hospital General Universitario  
Gregorio Marañón

Comunidad de Madrid



## DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D. Fernando Díaz Otero, Secretario del **COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA - ÁREA 1**

## CERTIFICA

Que ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

**TÍTULO:** "Alteración molecular de las diferentes estructuras articulares"

**PROMOTOR:** Investigador

y considera que :

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos legalmente establecidos, y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Además, el citado CEIC cumple las normas de BPC (CPMP / ICH / 135 / 95).

Este CEIC acepta que dicho estudio sea realizado por el investigador principal:

Dr. José Manuel Arguello Cuenca / Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología / Hospital General Universitario del Gregorio Marañón

Lo que firmo en Madrid, a 14 de noviembre de 2011

Fdo.: Dr. Fernando Díaz Otero

N.E.: --

C.P.: --

C.I.: 317/11

C/ Dr. Esquerdo 46. Pabellón de Gobierno, Planta baja, 28007 Madrid  
ceic.hgugm@salud.madrid.org Tel. 91-426 93 78 – Fax: 91-400 81 56

## ANEXO II: CONSENTIMIENTO INFORMADO

---

Usted tiene derecho a conocer el procedimiento al que va a ser sometido y las complicaciones más frecuentes que ocurren. Este documento intenta explicarle todas estas cuestiones; léalo atentamente y consulte con su médico todas las dudas que le se le planteen. Le recordamos que, por imperativo legal, tendrá que firmar, usted o su representante legal, el consentimiento informado para que podamos realizarle dicho procedimiento.

### 1. PROCEDIMIENTO

Consiste en la toma de muestras del tejido de la rodilla que va a ser intervenida, bien mediante procedimiento artroscópico, o bien de manera abierta. Concretamente se tomarán muestras de cartílago, grasa de Hoffa y líquido articular. Dicho acto será llevado a cabo en quirófano, con el paciente anestesiado y bajo estrictas medidas de esterilidad durante el acto quirúrgico que se indicó tras el diagnóstico inicial: lesión meniscal, inestabilidad femoro-patelar, lesión LCA o gonartrosis.

Posteriormente se remitirán al centro IMMA donde serán procesadas a fin de estudiar las alteraciones, cultivos y concentraciones de determinadas líneas celulares y biomarcadores asociados a la degeneración artrósica.

### 2. CONSECUENCIAS SEGURAS

Las propias de la intervención quirúrgica a la que va a ser sometido y de las que ha sido informado y ha dado su consentimiento.

### 3. DESCRIPCION DE LOS RIESGOS TIPICOS

Las propias de la intervención quirúrgica a la que va a ser sometido y de las que ha sido informado y ha dado su consentimiento.

### 4. RIESGOS PERSONALIZADOS

Además de los riesgos descritos anteriormente, por mis circunstancias especiales (médicas o de otro tipo) hay que esperar los siguientes riesgos:

### 5. BENEFICIOS

Es muy probable que no se produzca ningún beneficio directo sobre mí por participar en este estudio, pero con la información obtenida, es posible que sea útil para predecir qué pacientes van a desarrollar degeneración artrosis y de qué manera.

## 6. CONFIDENCIALIDAD

Los datos sobre el tratamiento realizado y los resultados obtenidos que puedan ser considerados de interés, podrán ser incluidos de forma ANONIMA en el estudio del propio médico con el fin exclusivo de la investigación. Su identidad será mantenida confidencial en la medida que la ley lo permita.

## 7. DECLARACION DE CONSENTIMIENTO

### PACIENTE

Yo Don/Dña.....He leído la hoja de información que me ha entregado el/la Dr.

/a.....He comprendido las explicaciones que se me han facilitado, y el médico que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas y preguntas que le he planteado. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto. Por ello, manifiesto que me considero satisfecho/a con la información recibida y que comprendo la indicación y los riesgos de este tratamiento/procedimiento. Y en tales condiciones CONSIENTO que se me realice la toma de muestras de mi rodilla durante el acto quirúrgico que motivó esta intervención.....

.....

.....

En ....., a ..... de.....de .....

Fdo. EL / LA DOCTOR / A Fdo. EL / LA PACIENTE

## REPRESENTANTE LEGAL

Yo, Don/Dña.....en calidad de.....  
..... del paciente.....He  
leído la hoja de información que me ha entregado el/la  
Doctor/a..... He comprendido las explicaciones que se  
me han facilitado, y el médico que me ha atendido me ha permitido realizar  
todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas y preguntas que le  
he planteado. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad  
de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto.  
En mi presencia se ha dado al paciente toda la información pertinente adaptada  
a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en someterse a este  
tratamiento/procedimiento. Por ello, manifiesto que me considero satisfecho/a  
con la información recibida y que comprendo la indicación y los riesgos de este  
tratamiento / procedimiento. Y en tales condiciones CONSIENTO que se realice  
al paciente la toma de muestras durante la cirugía en la rodilla de .....  
.....  
.....

En ....., a ..... de ..... de .....

Fdo. EL / LA DOCTOR / A Fdo. EL / LA REPRESENTANTE

## TESTIGO

Yo, Don/Dña. .... declaro bajo mi  
responsabilidad que Don/Dña..... ha  
recibido la hoja de información que le ha entregado el/la  
Doctor/a..... Ha comprendido las explicaciones que se le  
han facilitado, y el médico que le ha atendido le ha permitido realizar todas las  
observaciones y le ha aclarado todas las dudas y preguntas que le ha  
planteado. También comprende que, en cualquier momento y sin necesidad de  
dar ninguna explicación, puede revocar el consentimiento que ahora presta. Se  
considera satisfecho/a con la información recibida y comprende la indicación y  
los riesgos de este tratamiento/procedimiento. Y ha expresado libremente su  
CONSENTIMIENTO que se le realice al paciente la toma de muestras de grasa  
de Hoffa, líquido sinovial y cartílago articular.....  
.....  
.....

En ....., a ..... de ..... de .....

Fdo. EL / LA DOCTOR / A Fdo. EL / LA TESTIGO

## REVOCACION DE CONSENTIMIENTO

Yo, Don/Dña ..... REVOCO el consentimiento  
prestado en fecha ..... y declaro por tanto que, tras  
la información recibida, no consiento en someterme al procedimiento de

.....  
.....

En ....., a ..... de ..... de .....

Fdo. EL / LA DOCTOR / A Fdo. EL / LA PACIENTE



ANEXO III: V BECA DE INVESTIGACIÓN A LA  
CONDROPROTECCIÓN (HYALGAN®) 2011

---

Josep Verges <jverges@bioiberica.com>

09/27/11 at 4:06 PM

Parajosmarguello@yahoo.es

CCfblagar@sergas.es

Barcelona, 27 de septiembre de 2011

Apreciado Dr. José Manuel Argüello,

Después de haberse reunido el Comité evaluador de las Becas de investigación Hyalgan®, me complace comunicarle que el proyecto que ha presentado ha sido uno de los ganadores.

La entrega de las Becas Hyalgan® se hará el próximo 30 de septiembre en el Congreso de la SECOT durante el Simposio Bioibérica de "Artrosis: Necesidad de Nuevos enfoques terapéuticos", de 14:00 a 15:30 h, que tendrá lugar en el Palacio de Exposiciones y Congresos de Oviedo.

Rogamos nos confirme por favor, su asistencia.

Le adjunto el programa definitivo del Simposio para su información.

Reciba un cordial saludo,

Francisco J. Blanco

Presidente Comité Becas Investigación Hyalgan®

Josep Vergés

Secretario Comité Becas Investigación Hyalgan®

ANEXO IV: PRESENTACIÓN CONGRESO SEIQ

---



Madrid, 30 de septiembre de 2015

Estimado/a Dr/a ARGUELLO CUENCA:

Con motivo del “**XXI Congreso de la Sociedad de Investigaciones Quirúrgicas**”, que se celebrará en Madrid los días 15 y 16 de Octubre de 2015, es un placer notificarle que:

Una vez evaluadas todas las comunicaciones por los miembros del Comité Evaluador, la comunicación titulada **CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES DEL PAQUETE ADIPOSEO DE HOFFA EN PACIENTES CON DIFERENTE GRADO DE AFECTACIÓN ARTICULAR**, ha sido seleccionada para ser presentada en **formato de presentación Oral**.

Esta comunicación deberá ser presentada el día **16.10.2015** en la sesión **CIRUGÍA ORTOPÉDICA Y TRAUMATOLOGÍA** dentro del siguiente horario: **11:30 - 13:00**

La sala asignada es **Sala Paralela**.

## ANEXO V: PUBLICACIÓN TRABAJO

---

En preparación para ser enviado a un número especial de  
“Journal of Orthopaedic Research”



